



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Farmacia y Bioquímica**

**Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**

## **Estudio comparativo de la actividad antibacteriana y antioxidante de los extractos etanólicos de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth**

### **TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico**

### **AUTOR**

**Norah Miryam QUINTEROS ESPINO**

### **ASESOR**

**César Máximo FUERTES RUITÓN**

**Julio Reynaldo RUIZ QUIROZ**

**Lima, Perú**

**2017**

## Referencia bibliográfica

---

Quinteros N. Estudio comparativo de la actividad antibacteriana y antioxidante de los extractos etanólicos de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2017.

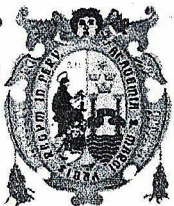
---



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América  
**Facultad de Farmacia y Bioquímica**  
**Decanato**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

“Estudio Comparativo de la Actividad Antibacteriana y Antioxidante de los extractos etanólicos de *Croton thurifer kunth* y *Croton collinus Kunth*”

Que presenta la Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

**NORAH MIRYAM QUINTEROS ESPINO**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

*dieciocho (18) sobresaliente*

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 13 de diciembre de 2017.

*Maria Elizabeth Gonzales Loayza*  
Dra. María Elizabeth Gonzales Loayza  
Presidente

*Mirtha Roque Alcarraz*  
Mr. Mirtha Roque Alcarraz  
Miembro

*Mónica Guadalupe Retuerto Figueroa*  
Mg. Mónica Guadalupe Retuerto Figueroa  
Miembro

*Margarita Eva Lobatón Erazo*  
Mg. Margarita Eva Lobatón Erazo  
Miembro

**“FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO”**

## **DEDICATORIA**

Con todo mi cariño y amor para mi abuelita Bernarda, porque con tu bondad y sacrificio lograste hacer de mí la mujer que soy ahora, gracias por criarme como tu hija. Esta tesis va dedicada a ti querida abuelita.

Gracias a la vida, por darme tan hermosa compañía y motivación para ser cada día mejor: a mi esposo Larry, porque eres mi apoyo constante y por todos los momentos en que fuiste padre y madre para permitirme cumplir mis sueños; y a mi querida hija Vania, por prestarme el tiempo que te pertenecía para terminar este proyecto, gracias mi princesita azul por tu amor infinito.

A todos aquellos que me apoyaron de manera incondicional a lo largo de mi vida y suplieron con éxito el lugar de mis padres. Gracias a todas mis madres: Miriam, Felícita, Livia, Juana, Ena, Zaida, María; y a todos mis padres: Pedro, Boris, Vlady, Nelson, Felipe, Jorge; por sus consejos y guiarme por el camino correcto.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi *alma mater*, la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, porque gracias a las experiencias y lecciones vividas en sus aulas, pude prepararme para los retos que nos pone la vida.

Agradezco infinitamente al Mg. César Fuertes Ruitón, mi asesor de tesis, por su paciencia y apoyo incondicional en este largo camino.

Al Mg. Julio Ruiz Quiroz, por su valiosa guía y asesoramiento.

A la Cátedra de Química Orgánica, por compartir sus conocimientos y brindarme todas las facilidades para llevar a cabo este proyecto.

Gracias a todas las personas que ayudaron directa o indirectamente a la realización de este proyecto.

# ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo General	2
1.2. Objetivos Específicos	2
1.3. Hipótesis	2
II. GENERALIDADES	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Familia Euphorbiaceae	6
2.3. Género <i>Croton</i>	7
2.3.1. Distribución geográfica.	8
2.3.2. Descripción botánica	9
2.3.3. Usos y propiedades	9
2.3.4. Investigación fitoquímica	11
2.3.5. Actividad biológica	12
2.4. Plantas medicinales para el estudio	14
2.4.1. <i>Croton thurifer</i> Kunth	14
2.4.2. <i>Croton collinus</i> Kunth	15
2.5. Compuestos bioactivos del género <i>Croton</i> .	16
2.5.1. Flavonoides	16
2.5.2. Alcaloides	20
2.5.3. Terpenoides	21
2.6. Actividad antioxidante	21
2.7. Actividad antibacteriana	22
III. PARTE EXPERIMENTAL	23
3.1. Materiales, equipos y reactivos	23
3.2. Instalaciones donde se realizó la investigación	24
3.3. Metodología	25
3.3.1. Flujograma del trabajo experimental	25
3.3.2. Recolección e Identificación de las especies	25
3.3.3. Dsecación	26

3.3.4. Molienda	26
3.3.5. Preparación del extracto	26
3.3.6. “Screening” fitoquímico	27
3.3.7. Determinación de la actividad antibacteriana	28
3.3.8. Determinación de la actividad antioxidante	30
IV. RESULTADOS	35
4.1. “Screening” fitoquímico	35
4.2. Actividad antibacteriana	37
4.3. Actividad antioxidante	40
V. DISCUSIÓN	46
VI. CONCLUSIONES	51
VII. RECOMENDACIONES	52
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
IX. ANEXOS	61



## **ABREVIATURAS**

**C:** *Croton*, Género de la familia Euphorbiaceae

**IC<sub>50</sub>:** Concentración máxima de la media inhibitoria

**DPPH:** Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo

**CMI:** Concentración Mínima Inhibitoria

**ABTS<sup>•+</sup>:** Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-Sulfónico

**ATCC:** Colección americana de cultivos tipo

**R.L:** Radicales Libres

**CCD:** Cromatografía en capa delgada

**E:** Extracto

**BHA:** Butilhidroxianisol

**BHT:** Butilhidroxitolueno

**M.P.:** Muestra Problema

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución de las especies de la Familia Euphorbiaceae en el mundo	6
<b>Figura 2.</b> Distribución y lugares clave de especies del género <i>Croton</i> en el mundo	8
<b>Figura 3.</b> Planta adulta de <i>Croton thurifer</i> Kunth	14
<b>Figura 4.</b> Planta adulta de <i>Croton collinus</i> Kunth	15
<b>Figura 5.</b> Estructura básica de los tipos de flavonoides	16
<b>Figura 6.</b> Estructura básica de los compuestos relacionados a los flavonoides	17
<b>Figura 7.</b> Núcleo bencilisoquinolínico	20
<b>Figura 8.</b> Taspina	20
<b>Figura 9.</b> Glaucina	20
<b>Figura 10.</b> Diagrama de flujo de la metodología	25
<b>Figura 11.</b> Reducción de resazurina	28
<b>Figura 12.</b> Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante	30
<b>Figura 13.</b> Placa con 96 pocillos para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólicos de <i>Croton thurifer</i> Kunth y <i>Croton collinus</i> Kunth contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	37
<b>Figura 14.</b> Placa con 96 pocillos para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólicos de <i>Croton thurifer</i> Kunth y <i>Croton collinus</i> Kunth contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	38
<b>Figura 15.</b> Comparación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólicos de <i>Croton thurifer</i> Kunth y <i>Croton collinus</i> Kunth contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	39
<b>Figura 16.</b> Porcentaje de captación de radicales libres del estándar de Vitamina C, lectura en espectrofotómetro UV-Visible a 517nm	40

<b>Figura 17.</b> Correlación entre las concentraciones del estándar de vitamina C vs % de captación de radicales libres, lectura en espectrofotómetro UV-Visible a 517nm	41
<b>Figura 18.</b> Porcentaje de captación de radicales libres del extracto etanólico de <i>Croton thurifer</i> Kunth, lectura en espectrofotómetro UV-Visible a 517nm	42
<b>Figura 19.</b> Correlación entre las concentraciones del extracto etanólico de <i>Croton thurifer</i> Kunth vs % de captación de radicales libres, lectura en espectrofotómetro UV-Visible a 517nm	43
<b>Figura 20.</b> Porcentaje de captación de radicales libres del extracto etanólico de <i>Croton collinus</i> Kunth, lectura en espectrofotómetro UV-Visible a 517nm	43
<b>Figura 21.</b> Correlación entre las concentraciones del extracto etanólico de <i>Croton collinus</i> Kunth vs % de captación de radicales libres, lectura en espectrofotómetro UV-Visible a 517nm	44
<b>Figura 22.</b> Comparación de la IC <sub>50</sub> del estándar de vitamina C, extracto etanólico de <i>Croton thurifer</i> Kunth y extracto etanólico de <i>Croton collinus</i> Kunth	45
<b>Figura 23.</b> Diseño de la placa de microdilución colorimétrica	63
<b>Figura 24.</b> Reacción de identificación de flavonoides mediante la reacción de Shinoda, del extracto etanólico de hojas de <i>Croton thurifer</i> Kunth y <i>Croton collinus</i> Kunth	64
<b>Figura 25.</b> Cromatogramas de la reacción de identificación de alcaloides mediante la reacción de Dragendorff por CCD, del extracto etanólico de hojas de <i>Croton thurifer</i> Kunth y <i>Croton collinus</i> Kunth	65
<b>Figura 26.</b> Reacción afrosimétrica de identificación de saponinas mediante la reacción de Agua destilada, del extracto etanólico de hojas de <i>Croton thurifer</i> Kunth y <i>Croton collinus</i> Kunth	66
<b>Figura 27.</b> Reacción de identificación de esteroides mediante la reacción de Liebermann Burchard, del extracto etanólico de hojas de <i>Croton thurifer</i> Kunth y <i>Croton collinus</i> Kunth	67

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características de las especies de la familia Eupobiaceae	7
<b>Tabla 2.</b> Tabla de Diversidad del género <i>Croton</i> en algunos países neotropicales	9
<b>Tabla 3.</b> Distribución y uso tradicional de algunas especies del género <i>Croton</i>	10
<b>Tabla 4.</b> Tamizaje fitoquímico de varias especies del género <i>Croton</i>	12
<b>Tabla 5.</b> Uso tradicional de extractos, aceites, metabolitos aislados de varias especies del género <i>croton</i>	13
<b>Tabla 6.</b> Principales efectos farmacológicos de diferentes flavonoides en humanos y animales	18
<b>Tabla 7.</b> Distribución de flavonoides en algunas especies del género <i>Croton</i>	19
<b>Tabla 8.</b> Porcentaje de monoterpenos y sesquiterpenos en diferentes especies del género <i>Croton</i>	21
<b>Tabla 9.</b> Materia prima y el solvente etanol 96 ° utilizados en la maceración	26
<b>Tabla 10.</b> Diseño de trabajo para el tratamiento de la muestra de <i>Croton thurifer</i> Kunth	31
<b>Tabla 11.</b> Diseño de trabajo para el tratamiento de la muestra de <i>Croton collinus</i> Kunth	32
<b>Tabla 12.</b> Diseño de trabajo para el tratamiento del estándar de vitamina C	33
<b>Tabla 13.</b> Marcha fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de <i>Croton thurifer</i> Kunth	35
<b>Tabla 14.</b> Marcha fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de <i>Croton collinus</i> Kunth	36
<b>Tabla 15.</b> Comparación de los diferentes metabolitos presentes en los extractos etanólicos de las hojas de <i>Croton thurifer</i> Kunth y <i>Croton collinus</i> Kunth	36

<b>Tabla 16.</b> Valores de la concentración mínima inhibitoria de <i>Croton</i> <i>thurifer</i> Kunth y <i>Croton collinus</i> Kunth sobre <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
<b>Tabla 17.</b> Capacidad antioxidante del estándar de Vitamina C	41
<b>Tabla 18.</b> Capacidad antioxidante del extracto etanólico de <i>Croton</i> <i>thurifer</i> Kunth	42
<b>Tabla 19.</b> Capacidad antioxidante del extracto etanólico de <i>Croton</i> <i>collinus</i> Kunth	44

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objetivo evaluar de forma comparativa la actividad antibacteriana y antioxidante de los extractos etanólicos de las hojas de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth. Se realizó un screening fitoquímico preliminar de los extractos etanólicos de las hojas de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth, detectándose la presencia de flavonoides, alcaloides, saponinas y esteroides para ambas especies. La actividad antibacteriana se determinó utilizando el método de microdilución colorimétrica en microplacas frente a las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; los resultados se evaluaron mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos contra las bacterias en estudio. El extracto etanólico de las hojas de *Croton thurifer* Kunth presentó actividad antibacteriana frente a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 con una CMI = 1000 µg/mL. La actividad antioxidante se evaluó mediante el método del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH); los resultados se expresaron por medio del valor de la IC<sub>50</sub>. El extracto etanólico de las hojas de *Croton thurifer* Kunth presentó una mayor IC<sub>50</sub>, con un valor de 28,4 µg/mL, en comparación con el extracto etanólico de las hojas de *Croton collinus* Kunth, que mostró un IC<sub>50</sub> de 62,42 µg/mL.

**Palabras clave:** *Croton thurifer* Kunth, *Croton collinus* Kunth, antibacteriana, antioxidante.

## ABSTRACT

This work aimed to comparatively assess the antibacterial and antioxidant activity of the ethanolic extracts from the leaves of *Croton thurifer* Kunth and *Croton collinus* Kunth. A previous phytochemical screening of the ethanolic extracts from the leaves of *Croton thurifer* Kunth and *Croton collinus* Kunth was conducted, finding the presence of flavonoids, alkaloids, saponins and steroids for both species. The antibacterial activity was determined by using the colorimetric microdilution method in microplates with the strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. The results were assessed by determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the extracts against the study bacteria. The ethanolic extract from the leaves of *Croton thurifer* Kunth presented antibacterial activity before a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 with a MIC = 1000 µg/mL. The antioxidant activity was assessed by the free radical method, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). The results were expressed through the IC<sub>50</sub> value. The ethanolic extract from the leaves of *Croton thurifer* Kunth presented a higher IC<sub>50</sub>, with a value of 28,4 µg/mL, in comparison with the ethanolic extract from the leaves of *Croton collinus* Kunth, which presented a IC<sub>50</sub> of 62,42 µg/mL.

**Key words:** *Croton thurifer* Kunth, *Croton collinus* Kunth, antibacterial, antioxidant.

## I. INTRODUCCIÓN

La utilización de plantas medicinales en nuestro medio, y el hecho que en la mayoría de ellas se encuentran principios activos empleados en el tratamiento de diversas enfermedades, ha incrementado el interés por su estudio<sup>1</sup>. La OMS (Organización Mundial de la Salud) estima que el 80 % de todos los habitantes de la tierra confían en las medicinas tradicionales para suplir sus principales necesidades de salud<sup>2</sup>.

Más del 80 % de los antimicrobianos empleados hoy en día proviene de biosíntesis o fermentación, mientras que la casi totalidad de las especies antioxidantes tiene un origen vegetal. La necesidad intrínseca de las plantas de disponer de un mecanismo de protección, en un ambiente caracterizado por una naturaleza oxidante (atmósfera oxigenada) y una diversidad microbiana patógena, sintetizan metabolitos para garantizar su adaptación al medio. En consecuencia, las especies vegetales son capaces de producir y bioprocasar un sinnúmero de metabolitos y elementos inorgánicos, que han sido extraídos y empleados empíricamente durante siglos por la población mundial en el tratamiento de estas patologías<sup>3</sup>.

El género *Croton* pertenece a la familia Euphorbiaceae, abarca cerca de 1300 especies entre árboles, hierbas y arbustos<sup>4</sup>, estando distribuidas ampliamente en las regiones tropicales y subtropicales de Asia, África y América<sup>5</sup>.

Los usos populares reportados para este género incluyen el tratamiento para el estreñimiento, la diabetes, los problemas digestivos, disentería, fiebre, hipercolesterolemia, hipertensión, malaria, dolor, cáncer, inflamación, úlceras<sup>6,7</sup> e infecciones<sup>8</sup>.

Esta diversidad de propiedades medicinales es muestra de la alta diversidad de metabolitos reportados para las especies del *Croton*: terpenoides<sup>9</sup>, aceites esenciales, alcaloides<sup>10</sup>, flavonoides, triterpenos y saponinas<sup>11</sup>.

*Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth son ampliamente utilizados como remedios tradicionales por la población de Amazonas como cicatrizantes y desinflamantes, sin embargo aún no se cuenta con estudios científicos que



puedan comprobar estas propiedades, ni la relación con sus componentes químicos; es por eso que el presente estudio pretende determinar la actividad antibacteriana y antioxidante de estas especies.

### **1.1. Objetivo General**

Determinar en forma comparativa la actividad antibacteriana y antioxidante de los extractos etanólicos de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth.

### **1.2. Objetivos Específicos**

- Realizar el “screening” fitoquímico en los extractos etanólicos de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth.
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth.
- Determinar la actividad antibacteriana de los extractos de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth.
- Realizar un análisis de la actividad antibacteriana y la actividad antioxidante de los extractos de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth.

### **1.3. Hipótesis**

**H<sub>1</sub>:** El extracto etanólico de las hojas secas de *Croton thurifer* Kunth tiene actividad antibacteriana y antioxidante.

**H<sub>2</sub>:** El extracto etanólico de las hojas secas de *Croton collinus* Kunth tiene actividad antibacteriana y antioxidante.

**H<sub>3</sub>:** El análisis comparativo de los extractos etanólicos de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth produce resultados diferenciales en cuanto a la actividad antibacteriana y antioxidante.

## II. GENERALIDADES

### 2.1. Antecedentes

Del extracto metanólico de las hojas de *Croton baillonianus*, mediante cromatografía de exclusión, con Sephadex LH-20 seguida de una purificación en cromatografía líquida de alta performance (HPLC); se aislaron alcaloides de baja polaridad y dos alcaloides en la forma de glicósidos, estos fueron analizados por espectrometría de masa de impacto electrónico (ESI-MS); estos alcaloides pertenecen al tipo bencilisoquinolínico. El estudio tiene conexión con la determinación de sus propiedades como antioxidante, antiulcerosa y citotóxica<sup>12</sup>.

En las hojas de *Croton linearis* Jacq. se identificaron siete compuestos: dos alcoholes de cadena larga: 2-metil-tetradecan-2-ol y el hexacosanol; un alcano lineal saturado: tetracosano; tres ácidos grasos: ácido esteárico, ácido 5,8-dien-tetradecanóico y ácido oléico; así como una flavona trimetoxilada: 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona. Las estructuras de los compuestos se elucidaron utilizando la Resonancia Magnética Nuclear (<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C) unidimensional y bidimensional, así como también Cromatografía Gaseosa/Espectrometría de Masas y los índices de retención de Kovats en casos necesarios. La posición de los sustituyentes se asignó por la combinación de los experimentos heteronucleares HMBC, HMQC y homonuclear <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY<sup>13</sup>.

El aceite esencial del *Croton malambo* tiene actividad antioxidante. El aceite esencial fue obtenido de la corteza de *C. malambo* por hidrodestilación, la composición química volátil fue determinada mediante cromatografía de gases acoplada a detector de espectrometría de masas. La capacidad antioxidante del aceite esencial de *C. malambo* se realizó a través del ensayo de decoloración del catión radical ABTS<sup>•+</sup>. El compuesto mayoritario encontrado en el aceite esencial de *C. malambo* fue el metil eugenol (63,5 %) y el linalool (5,6 %). La actividad antioxidante total obtenida fue de 2,2 mmol trolox/kg de aceite esencial<sup>14</sup>.

El aceite esencial<sup>15</sup> obtenido de la corteza de tallo *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) se analizó por Cromatografía de Gases y Cromatografía de Gases-Espectrofotometría de masas. Se identificaron 83 compuestos, resaltando la presencia de borneol (14,7 %), acetato de bornilo (5,2 %), 1-isopropil-7-metil-4-metilen-1,3,4,5,6,8-hexahidro-2H-naftalen-4a-ol (14,7 %), sesquicineole (10,5 %) y el epóxido de  $\gamma$ -gurjuneno (5,4 %) entre los principales componentes. El valor EC<sub>50</sub> del aceite esencial bruto en el ensayo de captación de radicales libres DPPH fue 3.21 mg mL<sup>-1</sup>.

La fracción del aceite esencial<sup>15</sup> crudo que presentó actividad antioxidante se purificó por Cromatografía en Capa Fina sobre gel de sílice. La Cromatografía de Gases y el análisis Cromatografía de Gases - Espectrofotometría de masas reveló que  $\alpha$ -bisabolol (38,3 %),  $\alpha$ -eudesmol (9,3 %) y guaialol (8,2 %) fueron los principales componentes de la fracción antioxidante. El valor EC<sub>50</sub> medido para la fracción de aceite bioactivo en el ensayo de DPPH fue 1,05 mg mL<sup>-1</sup>. La actividad antimicrobiana del aceite esencial bruto se sometió a ensayo frente a bacterias siete Gram-positivas y Gram-negativas y tres levaduras. Los valores de CMI medidos variaron de 1,25 a 10,00 mg mL<sup>-1</sup>.

Las películas de quitosano-alcohol polivinílico por radiación gamma fueron embebidas en extractos hidroalcohólico, alcohólico y acuoso de *Croton lechleri* (sangre de grado), y evaluadas sus propiedades antimicrobianas frente a cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se encontró que estas películas, al igual que el látex de sangre de grado, tienen actividad sólo frente a *Staphylococcus aureus*. Estas películas tienen potencial aplicación en el tratamiento de heridas<sup>16</sup>.

La bibliografía también reporta la capacidad antioxidante de nueve extractos de las plantas medicinales siguientes<sup>17</sup>: *Cinnamomum zeylanicum* «canela», *Calophyllum brasiliense* «lagarto caspi», *Myrciaria dubia* «camu camu», *Minthostachys mollis* «muña», *Alchornea castaneifolia* «hiporuro», *Smallanthus sonchifolius* «yacón», *Lepidium peruvianum* y *Lepidium meyenii* «maca». La evaluación de la actividad antioxidante se realizó por el método de la

decoloración del radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH). La capacidad antioxidante obtenida a las concentraciones de 1 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL y 200 µg/mL fueron: canela (Extracto etanólico de la corteza) 97,59 % a una concentración de 1 µg/mL, lagarto caspi (E. metanólico de hojas) 99,76 % a 50 µg/mL, camu camu (E. metanólico del fruto) 98,09 % a 50 µg/mL, muña (E. acuoso de hojas) 92,41 % a 50 µg/mL, hiporuro (E. metanólico de hojas) 75,96 % a 50 µg/mL, Lagarto (E. acuoso de hojas) 110,56 % a 100 µg/mL, maca K (E. acuoso de hipocotilo) 95,55 % a 200 µg/mL y maca A (E. metanólico de hipocotilo) 88,21 % a 200 µg/mL, comparados frente al ácido ascórbico (vitamina C), la cual presentó una actividad antioxidante de 92,82 %.

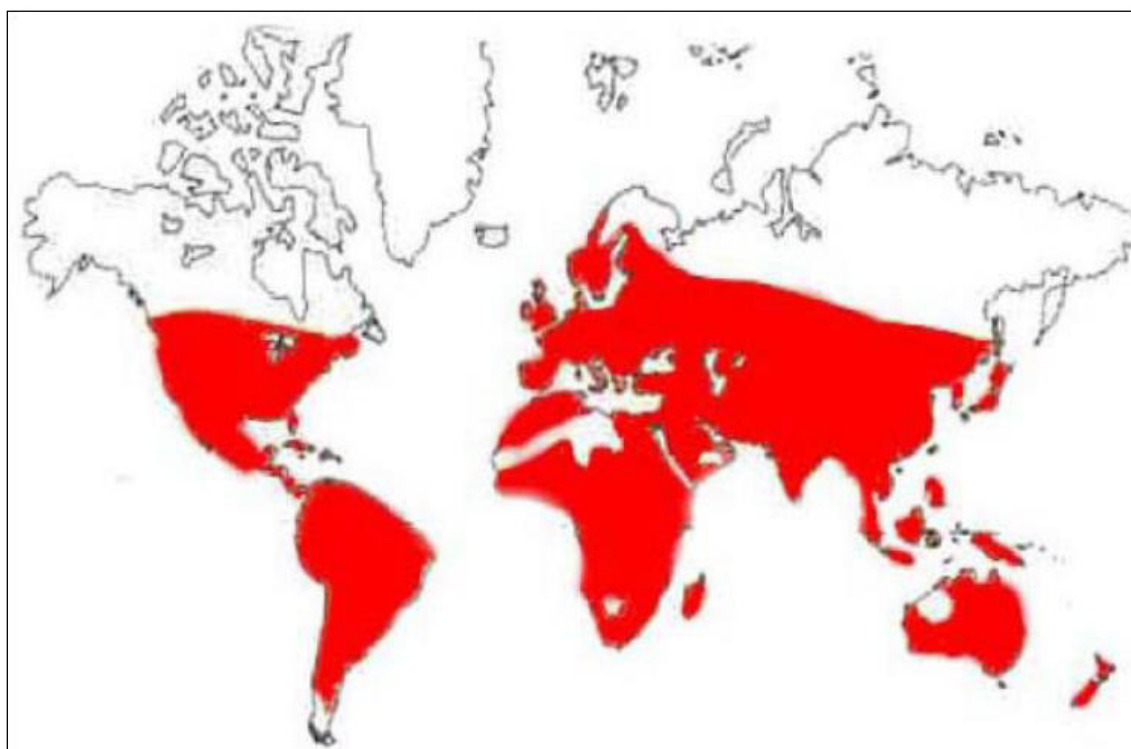
Tovar<sup>18</sup> evaluó la actividad antioxidante por medio de dos modelos *in vitro* (DPPH y ABTS<sup>•+</sup>) en los extractos crudos de metanol y diclorometano, de 30 plantas pertenecientes a 8 familias y caracterizó por medio del perfil cromatográfico el tipo de flavonoides.

El 50 % de los extractos de metanol evaluados presentaron un porcentaje de actividad antioxidante superior al 25 %; por el contrario los extractos de diclorometano solo fue del 18,5 %. Para ambos ensayos DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>•+</sup> los extractos de metanol mostraron un porcentaje de actividad antioxidante mayor que los de diclorometano. Las especies estudiadas fueron *Topobea cf discolor* (40,80 %) y *Alchornea grandis* (39,27 %) pertenecientes a las familias *Melastomataceae* y *Euphorbiaceae* respectivamente; adicionalmente el extracto de diclorometano de *Tovomita guianensis* (Clusiaceae), presentó el mayor porcentaje de actividad antioxidante con un valor de 54,97 %; además, ambos extractos de las plantas de la familia Clusiaceae fueron activas, debido a esto se escogieron las especies *Tovomita guianensis* y *Clusia multiflora* para realizar el perfil cromatográfico de flavonoides, buscando a la posible similitud fitoquímica y adicionalmente también se analizó el extracto de metanol de *Topobea cf discolor* por su destacado porcentaje de actividad antioxidante. Por medio de los espectros UV-Visible de las señales cromatográficas de cada extracto se logró identificar que los flavonoides más abundantes de estas plantas fueron flavonas y flavonoles teniendo en cuenta que sus espectros revelaron dos bandas, una entre los 300 - 390 nm (banda I) característica para este tipo de flavonoides y

otra entre los 220 - 290 (banda II) y en menor cantidad flavononoles, flavonononas e isoflavonas.

## 2.2. Familia Euphorbiaceae

La familia Euphorbiaceae abarca alrededor de 200 géneros y 7000 especies de amplia distribución y extrema diversidad botánica<sup>19</sup> ubicándose la mayoría de ellas en América y África tropical<sup>20</sup> (**Figura 1**). La familia Euphorbiaceae es reconocida en el Perú por presentar 61 géneros y 323 especies, mayormente arbustos y árboles. El género *Croton* es el más numeroso en especies endémicas. Los taxones endémicos ocupan varias regiones, entre ellas Bosques Húmedos Amazónicos, Mesoandina y Bosques Muy Húmedos Montanos, entre los 110 y 3200 metros de altitud<sup>21</sup>.



**Figura 1. Distribución de las especies de la Familia Euphorbiaceae en el mundo<sup>22</sup>**

En la actualidad, la familia de las Euphorbiaceae es una de las angiospermas con más diversidad en cuanto a su hábitat. En cuanto a morfología se refiere, varían en tamaño desde los árboles con gran altura como por ejemplo (*Havea*)

de la selva amazónica hasta las pequeñas plantas con apariencia de cactus que se encuentran en África<sup>23</sup>. La familia se caracteriza principalmente por las flores unisexuales, hojas generalmente alternas, látex en general presente, ovario súpero, en su mayoría tricarpelar y trilocular, con un óvulo por lóculo. El fruto es, generalmente, un esquizocarpo, con semillas de tegumento fino, óseo o carnososo, a menudo provistas de carúncula y de endosperma abundante<sup>24</sup>.

Una descripción general de las especies de la familia Euphorbiaceae se presenta a continuación de acuerdo a las siguientes características (**Tabla 1**):

**Tabla 1. Características de las especies de la familia Euphorbiaceae<sup>23</sup>**

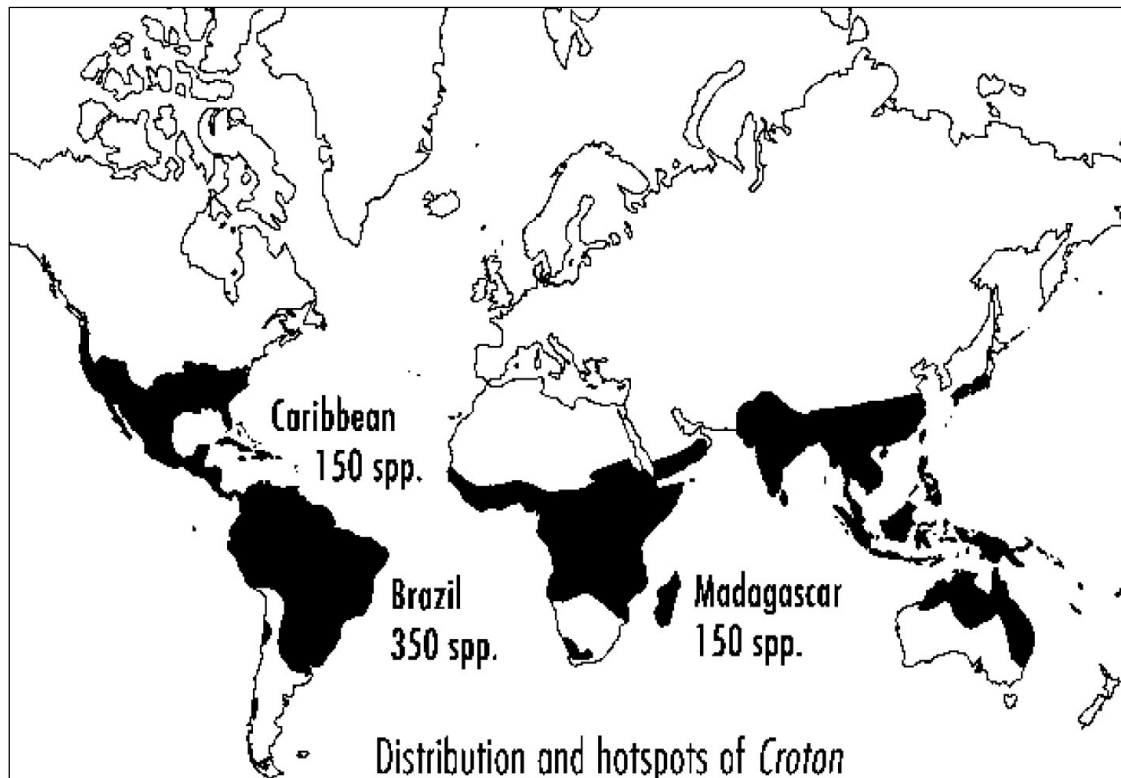
<i>Hábito:</i>	Hierbas o arbustos, algunas xerofíticas y con apariencia de cacto, a menudo con savia lechosa.
<i>Hojas:</i>	Alternas simples o compuestas, a menudo reducidas o deciduas en las especies xerofíticas; con estipulas.
<i>Inflorescencias:</i>	Variadas, a menudo condensadas, de ahí la apariencia de una sola flor, un ciatio, plantas monoicas o dioicas
<i>Flores:</i>	Unisexuales, actinomorfas. Cáliz de 5 sépalos o ninguno Corola de 5 pétalos o ninguno. Androceo de 1 a muchos estambres, libres o unidos, a menudo presenta un ovario rudimentario en las flores masculinas. El gineceo está constituido por un pistilo compuesto de 3 carpelos unidos, con 3 lóculos, óvulos solitarios o pareados, placentación axilar, ovario súpero estilos libres o unidos en la base.
<i>Fruto:</i>	Esquizocarpo o una cápsula.
<i>Semilla:</i>	A menudo con una carúncula conspicua.

### **2.3. Género *Croton***

El género *Croton* abarca cerca de 1300 especies<sup>4</sup>; es el segundo mayor y más diverso de la familia Euphorbiaceae<sup>25</sup>.

### 2.3.1. Distribución geográfica.

El género *Croton* tiene una distribución pantropical, pero con una significativa concentración en las en las regiones tropicales y subtropicales de Asia, Américas y África<sup>5, 25</sup> (**Figura 2**)



**Figura 2. Distribución y lugares clave de especies del género *Croton* en el mundo<sup>4</sup>**

En términos cuantitativos<sup>26</sup>, a partir de la investigación desarrollada por *Murillo* 1999, en Colombia se registraron 83 especies de *Croton* distribuidas en 19 departamentos. En comparación con otros países del trópico, se llegó a la conclusión preliminar que el país colombiano posee la mayor diversidad de especies con un 10,5 %, después de Brasil y seguida por Venezuela con un 8,4 % (**Tabla 2**).

**Tabla 2. Tabla de Diversidad del género *Croton* en algunos países neotropicales<sup>26</sup>**

País	Número de especies	% del total de especies del género <i>Croton</i>
Colombia	83	10.5
Venezuela	67	8.4
Cuba	59	7.4
Perú	48	6.0
Guatemala	32	4.0
Costa Rica	30	3.8
Guianas	27	3.4

### **2.3.2. Descripción botánica**

Estas especies tienen un hábito desde hierbas hasta árboles con una morfología foliar muy variada, además segregan por lo general un exudado coloreado. Tiene la presencia de tricomas en la superficie de la hoja, con glándulas en la base de la lámina y/o el peciolo, las flores femeninas presentan pétalos reducidos o ausentes, el ovario es tricarpelar con un óvulo por lóculo o cámara. Las características de la flor en mención, además, del grado de desarrollo de los sépalos femeninos y la división de los estilos, han servido para diferenciar las especies del género. Otros caracteres como las estipulas, el tipo de venación, la forma de las hojas y las glándulas representan elementos importantes para la diferenciación de las especies<sup>23</sup>.

### **2.3.3. Usos y propiedades**

Algunas especies de esta familia son usadas ampliamente en medicina popular por sus múltiples efectos (**Tabla 3**). Varias especies del género *Croton* han sido tradicionalmente usadas en América Latina como remedios locales para una gran variedad de enfermedades y dolores. Estas plantas son utilizadas por curanderos, homeópatas e inclusive médicos. Las aplicaciones específicas forman parte del acervo cultural de cada región. Algunas especies se suponen útiles para una amplia gama de padecimientos y se venden o utilizan como remedios curalotodo. Por ejemplo, *Croton flavens* ha sido usada para tratar



problemas a la próstata, congestión nasal, fiebre, reumatismo, dolores de estómago, enfermedades de la piel, sífilis y neumonía. También se utiliza como expectorante y en el tratamiento de heridas. Tal variedad de propiedades farmacológicas se atribuye, entre otras cosas, a la presencia de alcaloides. Otro ejemplo lo constituye *Croton nivens*, especie que ha sido usada como tónico y antipirético, al igual que en el tratamiento de hemorroides, diarrea crónica, disentería, dolores reumáticos, colon irritado y molestias menstruales<sup>20</sup>.

**Tabla 3. Distribución y uso tradicional de algunas especies del género *Croton*<sup>8</sup>**

Autor (s)	Especie de <i>Croton</i>	Ubicación de las especies	Identificación de la planta	Nombre (s) local / nombre vernacular	Uso tradicional
Matías et al. 2011	<i>C. campestris</i>	Municipalidad de Crato, Ceara, Brasil	Herbario da Universidade Federal do Rio Grande do Norte	Velame do campo	Depurativo contra escrofulosis, enfermedades venéreas, enfermedades de la piel, reumatismo, úlceras, tumores
Selowa et al. 2010	<i>C. megalobotrys</i> <i>C. steenkapianus</i> <i>C. silvaticus</i>	Jardín Botánico Nacional Lowveld en Nelspruit, Sudáfrica	Personal del Jardín Botánico Nacional Lowveld	N/A	Utilizado como purgante
Rodrigues et al. 2009	<i>C. zehntneri</i>	Condado de Crato, Estado de Ceara, Brasil	Herbario Da'rdano Andrade Lima, Universidad de la Región Cariri, URCA, Brasil	N/A	Sedante, estimulante del apetito, antianorexígenos, alivio de los trastornos gastrointestinales
Shalid et al. 2008	<i>C. tiglium</i>	Escuela de Agricultura Punjab	Departamento de Botánica, Universidad de Agricultura, Faisalabad, Pakistán	N/A	Utilizado como purgante y antiespasmódico.
Aliviano et al. 2005	<i>C. cajucara</i>	Granja Experimental Embrapa, Amazonas, Brasil	Granja Experimental Embrapa, Amazonas, Brasil	N/A	Actividad antileishmánica
Lall y Meyer 1999	<i>C. pseudopulchellus</i>	Partes del centro y sur de Sudáfrica (Lady Grey, Norte de Aliwal, Elliot,	Herbario Schweicherdt HGWJ de la Universidad de Pretoria y Herbario del	N/A	Síntomas de tuberculosis como tos, fiebre, sangre en esputo

		Este de Berkley, Durban, Umalazi)	Instituto Botánico Nacional, Pretoria, Sudáfrica		
Abo et al. 1999	<i>C. zambesicus</i>	La recolección se realizó en Ibadan, Nigeria	Instituto de Investigación Forestal de Nigeria	“Iyeye”, “Ajekofole”	Tifoidea, diarrea, disentería
Peres et al.	<i>C. urucurana</i>	Dourados MS, Brasil	Herbario del Centro de Ciencias Biológicas e da Saude, Campo Grande MS Brasil	Sangra d’agua (sangre de Drago)	Infecciones en las heridas, celeridad en curación de heridas, reumatismo, cáncer
McChesney et al. 1991	<i>C. sonderianus</i>	Sobral, Ceara, Brasil	Herbario de Botánica, Universidad de Ceara, Brasil	Marmeleiro preto	Enfermedades gástricas
Wagate et al. 2010	<i>C. macrostachyus</i>	Regiones de Machakos y Kitui del oriente de Kenia	Departamento de manejo de Tierras y Recursos y Tecnología Agrícola, Universidad de Nairobi, Kenia	Mukambi/Kitundu	Tifoidea y sarampión

#### 2.3.4. Investigación fitoquímica

La química de metabolitos de las especies del género *Croton* es considerablemente diversa (**Tabla 4**), se generaliza como aspecto químico característico de las especies del género *Croton* que los triterpenos seguidos de flavonoides y alcaloides son los principales metabolitos detectados. Los terpenoides son los constituyentes predominantes del metabolito secundario en el género, principalmente diterpenoides, que pueden pertenecer a los tipos esqueleto cembranoide, clerodano, neoclerodano, halimano, isopimarano, kaurano, secokaurano, labdano, forbol y traquileo. Los triterpenoides, ya sea pentacíclicos o esteroideos, han sido frecuentemente reportados para especies de *Croton*. Los aceites volátiles que contienen mono y sesquiterpenoides, y a veces también compuestos derivados de shikimato, no son raros en el género. Varias especies han sido reportadas como fuentes de diferentes alcaloides, un hecho que realza considerablemente la importancia del género desde el punto de vista medicinal. Se han descrito con frecuencia sustancias fenólicas, entre las que predominan los flavonoides, lignoides y proantocianidinas. Otros metabolitos reportados para las especies del género *Croton* son aminoácidos, cardenólidos, saponinas, taninos <sup>6,19</sup>.

**Tabla 4. Tamizaje fitoquímico de varias especies del género *Croton*<sup>19</sup>**

Especie	PA	Alc	Ami	Car	Fen	Fla	Pro	Qui	Sap	Tan	Tri
<i>Croton betulinus</i>	H	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
	T	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Croton craspedotrichus</i>	H	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
	T	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>Croton excisus</i>	H-FL	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+
	T	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+
<i>Croton glandulosus</i>	T	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+
<i>Croton litoralis</i>	H	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
	T	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Croton lucidus</i>	H	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
	T	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
<i>Croton micradenus</i>	H-T	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>Croton monogynus</i>	H	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
	T	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>Croton myricifolius</i>	H	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
	T	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
<i>Croton nummulariaefolius</i>	H-T-R	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>Croton organifolius</i>	H-T	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+
<i>Croton rosmarinoides</i>	H-T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Croton stenophyllus</i>	H-FR	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+
	T	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+
<i>Croton yunquensis</i>	H	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	T	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+

H: hojas; T: tallos; R: raíces; FL: flores; FR: frutos; (+): presencia; (-): ausencia; PA: parte analizada; Alc: alcaloides; Ami: aminas; Car: cardenólidos; Fen: fenoles simples; Fla: flavonoides; Pro: proantocianidinas; Qui: quinonas; Sap: saponinas; Tan: taninos; Tri: triterpenos y esteroides.

### 2.3.5. Actividad biológica

Los usos tradicionales de diferentes especies de *Croton* han sido frecuentemente confirmados por ensayos farmacológicos. Salatino et al (2007)<sup>6</sup> presentó una revisión sobre las actividades químicas y farmacológicas de extractos crudos y metabolitos puros de diferentes especies de *Croton* (Tabla 5) utilizado en la medicina tradicional. Las actividades biológicas registradas para los metabolitos de *Croton* incluyen antihipertensivos, anti-cancerígenos, anti-plasmodiales, anti-inflamatorios, antimaláricos, antimicrobianos, antifúngicos, antiespasmódicos, anti-ulcerosos, antivirales, antidiarreicos, antioxidantes, antilipidémicos, miorelaxantes y citotóxicos<sup>5</sup>.

**Tabla 5. Uso tradicional de extractos, aceites, metabolitos aislados de varias especies del género *croton*<sup>6</sup>**

<b>Especies</b>	<b>Usos tradicionales</b>	<b>Efectos de partes de las plantas y componentes aislados relevantes</b>
<i>C. arboreous</i>	Antiinflamatorio	Cuatro sesquiterpenos → antiinflamatorio
<i>C. cajucara</i>	Diabetes, hipercolesterolemia, trastornos digestivos, trastornos hepáticos, pérdida de peso	Aceite volátil de corteza → cicatrización de úlceras gástricas, antileishmania; extracto de agua de la corteza → reducción del aumento de peso y mayor sensibilidad de adipocitos a isoprenalina y adrenalina; ácido acetil aleurítico, trans-dehidrocrotonina, trans-crotonina → efectos hipolipidémicos e hipoglucemiante; trans-crotonina → antiestrógeno, anticancerígeno; linalool → antibacteriano y antifúngico
<i>C. celtidifolious</i>	Inflamación, leucemia, úlceras, reumatismo	Corteza → antiinflamatorio y antioxidante
<i>C. eluteria</i>	Bronquitis, fiebre, malaria, malestar digestivo, hipertensión	Extractos de corteza amarga → estimulación de secreción gástrica
<i>C. kongensis</i>	Dismenorrea	Diterpenos secocauranos → citotóxico, antimicrobacteriano y antimalarial
<i>C. lechleri</i>	Hemostáticas, cicatrización, purgante	Látex rojo → antiinflamatorio, antiviral, antibacteriano, antileucémico; SP-303 → antiviral: virus respiratorio sincitial, lesiones simples anogenitales y genitales
<i>C. macrostachys</i>	Purgante, diabetes	Semillas y raíces → purgantes
<i>C. malambo</i>	Dolor, reumatismo, inflamación, diarrea, diabetes, úlcera gástrica	Extracto de corteza → anticonceptivo, antiinflamatorio
<i>C. nepetaefolius</i>	Malestar gástrico, flatulencias, cólicos intestinales, aperitivo	Aceite volátil → antiespasmódico; cineol, metileugeno → miorrelajante y antiespasmódico
<i>C. oblongifolius</i>	Múltiples usos, incluyendo agrandamiento del hígado, fiebre y platelmintos	Extracto del tallo → actividad antihepatotóxica; diterpenos → citotóxico
<i>C. palanostigma</i>	Inflamación intestinal, cicatrización, úlceras gástricas	Taspina → citotóxica
<i>C. schiedeana</i>	Hipertensión	Extractos etanólicos y acuosos; quercetina-3,7-dimetil éter → vasorrelajante y antihipertensivo
<i>C. tonkinensis</i>	Dolor estomacal, dispepsia, úlceras gástricas y duodenales, lepra, soriasis, urticaria	Diterpeno citotóxico
<i>C. sublyratus</i>	Problemas antihelmínticos y dermatológicos	Plaunotol → actividad de úlcera anti-péptica, anticancerígeno, antibacterial
<i>C. urucurana</i>	Analgésico, inflamación, infección de heridas, cicatrización, cáncer	Látex rojo de corteza → antidiarreico, antifúngico; ácido acetil aleurítico, catequina → antibacteriano; ácido acetil aleurítico → analgésico
<i>C. zambesicus</i>	Fiebre, malaria, convulsiones, hipertensión, infecciones microbianas, disentería	Hojas → citotoxicidad; diterpeno trachilobano → citotóxico
<i>C. zehntneri</i>	Trastornos nerviosos, anorexia, trastornos gastrointestinales, edulcorante	Aceite volátil → relajante muscular intestinal, efecto central depresor, antinociceptivo; anetol y estragol → relajante muscular intestinal; anetol → anticarcinogénico

## 2.4. Plantas medicinales para el estudio

### 2.4.1. *Croton thurifer* Kunth

#### Clasificación Taxonómica

La clasificación taxonómica se realizó según el Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist (1981) (**Anexo 1**).

**REINO:** Plantae

**DIVISIÓN:** Magnoliophyta

**CLASE:** Magnoliopsida

**SUBCLASE:** Rosidae

**ORDEN:** Euphorbiales

**FAMILIA:** Euphorbiaceae

**GÉNERO:** *Croton*

**ESPECIE:** *Croton thurifer*  
Kunth

**Nombre vulgar:** Cullishina



**Figura 3. Planta adulta de *Croton thurifer* Kunth (Fotografía tomada en el Distrito de Bagua Grande, Amazonas)**

#### Descripción botánica

Arbusto, hasta 2 metros de alto, ramas leñosas suavemente estrellado-tomentoso con hojas rómbico-ovadas más o menos equidistantes o rotundas con el primer par de nervios por lo generalmente prolongado al menos hasta la mitad de la hoja; hojas oblicuamente redondeadas a agudas o a menudo cuneadas en la base; redondeadas, obtusas o brevemente agudas en el ápice a menudo oblicuo, 3 - 8 cm de largo, 2 - 8 cm de ancho, más o menos glandular en la base, las glándulas algunas veces cortas, pecíolos de 1 – 2,5 cm de largo, hispiduloso y densamente tomentuloso como las ramas levemente angulosas; inflorescencia en racimos densos o laxos cuando están bien desarrollados. Largo o más largo, el raquis angulado, las brácteas minúsculas; el cáliz femenino cupulado, los pequeños segmentos ovalados no están del todo presentes; pétalos masculinos lanosos por la parte inferior; estambres alrededor de 16, pilosos en la base; ovario hispido y estrellado con estilos cortos y rígidos. Cápsulas tricocas.

## Usos

El látex es cicatrizante y desinflamante, se emplea para extraer espinas u objetos extraños que penetran a los músculos o al cuerpo humano, y también para curar dermatitis en los vacunos (**Fuente: propia**).

### 2.4.2. *Croton collinus* Kunth

#### Clasificación Taxonómica

La clasificación taxonómica se realizó según el Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist (1981) (**Anexo 2**).

**REINO:** Plantae

**DIVISIÓN:** Magnoliophyta

**CLASE:** Magnoliopsida

**SUBCLASE:** Rosidae

**ORDEN:** Euphorbiales

**FAMILIA:** Euphorbiaceae

**GÉNERO:** *Croton*

**ESPECIE:** *Croton collinus*  
Kunth

**Nombre vulgar:** Mosquera



**Figura 4. Planta adulta de *Croton collinus* Kunth (Fotografía tomada en el Distrito de Cumba, Amazonas)**

#### Descripción botánica

Arbustos hasta 3 metros de alto, ramas laxas, típicamente con indumento corto apresado; hojas ovadas, agudas, a menudo redondeadas, ligeramente peltadas en la base, 3 - 5 cm de largo, hasta de 3 cm de ancho, sinuadas u onduladas, de color verde característico (verdes amarillentas), densamente tomento estrellado por el haz y envés, nervadura pinnada, nervios prominentes en el envés; glándulas sésiles en la base del limbo, típicamente 4 glándulas o algunas veces menos, generalmente 2 o incluso obsoletas u ocultas; pecíolos 8 - 10 mm de largo o algo más largo; inflorescencias en racimos cortos, flores masculinas con

15 - 18 (-20) filamentos pubescentes, flores femeninas con estilos bífidios. Frutos en cápsulas tricocas densamente estrellado tomentoso.

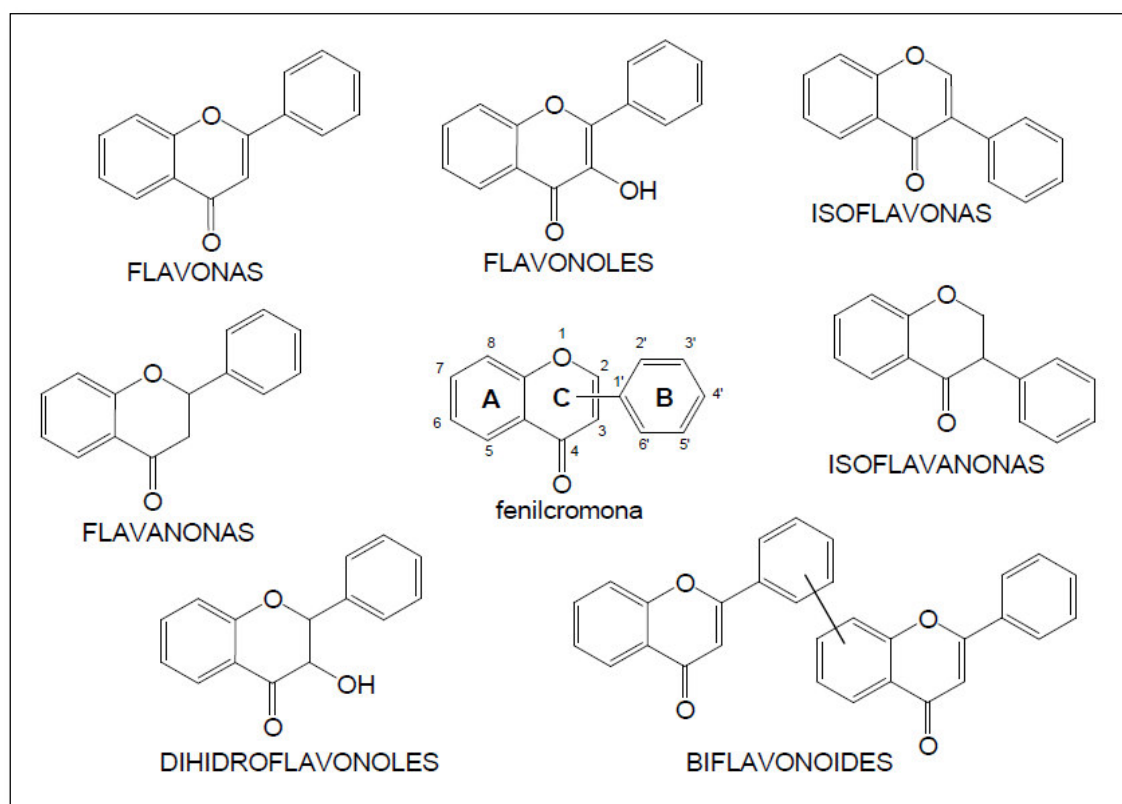
## Usos

El látex es cicatrizante de heridas, desinflama los abscesos, también se utiliza contra hongos de la piel (**Fuente: propia**).

## 2.5. Compuestos bioactivos del género *Croton*.

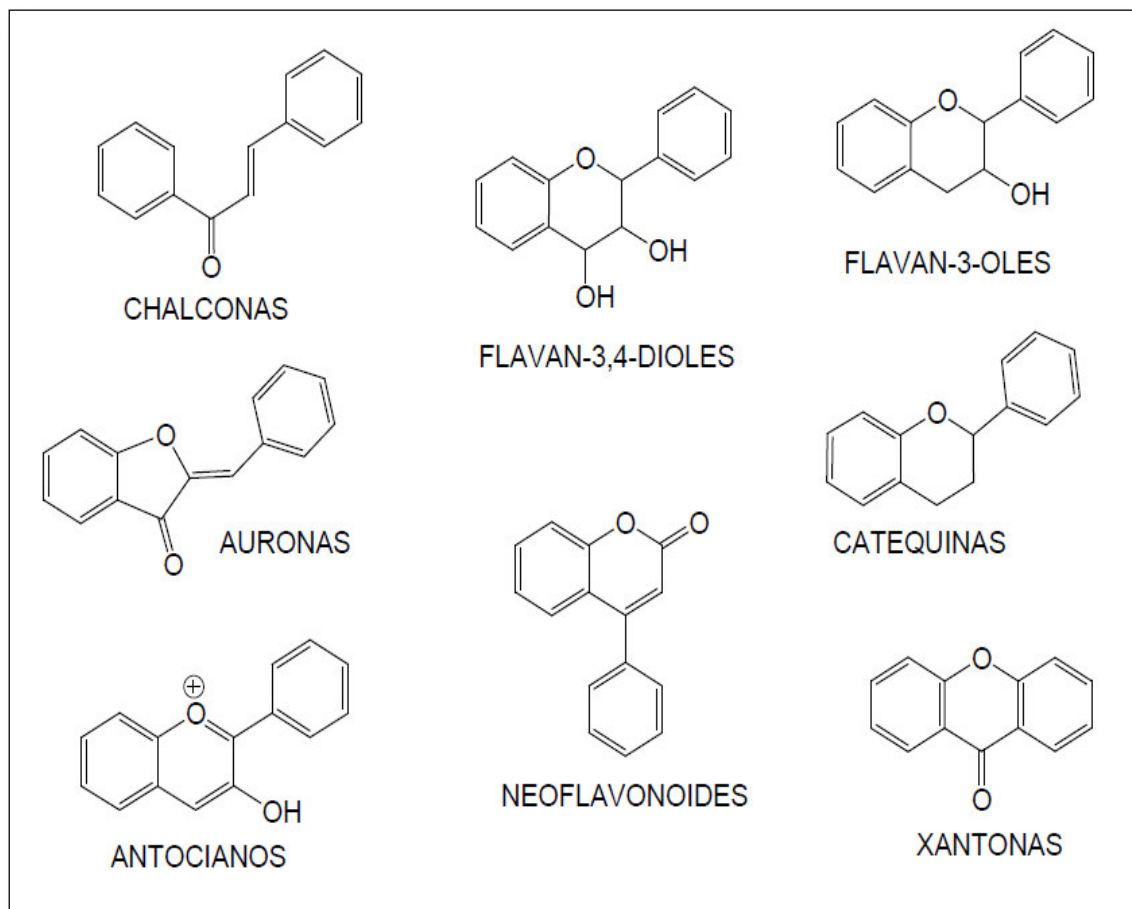
### 2.5.1. Flavonoides

Estas sustancias tienen en común las estructuras C6-C3-C6, consisten de dos anillos aromáticos enlazados por un heterociclo oxigenado, Dentro de los muchos flavonoides descritos, las mayores clases son los flavonoles, catequinas o flavonas, antocianidinas e isoflavonas (**Figura 5**), sin embargo, en estas clases hay grandes variaciones estructurales (**Figura 6**), dependiendo del nivel de hidrogenación, hidroxilación, metilación y sulfonación de las moléculas<sup>27</sup>.



**Figura 5. Estructura básica de los tipos de flavonoides<sup>28</sup>**





**Figura 6. Estructura básica de los compuestos relacionados a los flavonoides<sup>28</sup>**

Desde el punto de vista de sus propiedades biológicas, numerosos estudios *in vitro* ponen de manifiesto que estos compuestos tienen efectos antioxidantes, reducen la formación de radicales libres, pueden inhibir la peroxidación lipídica, poseen efectos antimutagénicos y tienen la capacidad de inhibir diversas enzimas. Asimismo, estudios *in vivo* demuestran que los flavonoides potencialmente presentan numerosas actividades farmacológicas, destacando las acciones protectora vascular, antiaterogénica, antianginosa, antitumoral, analgésica, antiinflamatoria, antialérgica, antiulcerosa y hepatoprotectora, entre otras (**Tabla 6**)<sup>28</sup>.



**Tabla 6. Principales efectos farmacológicos de diferentes flavonoides en humanos y animales<sup>28</sup>**

ACTIVIDADES FARMACOLÓGICAS	COMPUESTOS
<b>Analgésica</b>	Quercetina, hesperidina, miricitrina, 5,7-dimetoxi-flavanona-4'-O-[ $\beta$ -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucopiranosido, 2'-hidroxi-4',6'-dimetoxi-chalcona-4-O- $\beta$ -D-glucopiranosido
<b>Antialérgica</b>	Quercetina
<b>Antiaterogénica</b>	Quercetina
<b>Anticancerígena</b>	Baicaleína, epigallocatequina, kaenferol-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosido, nobiletina, quercetina, rutina, tangeretina, tricina, woogonina
<b>Antidiabética</b>	Quercetina
<b>Antidiarréica</b>	Apigenina, kaenferol, morina, miricetina, naringenina, quercetina, quercitrina
<b>Antihepatotóxica</b>	Gosipina, hispidulina, hidroxietilrutósido, kolavirona, quercetina, silimarina
<b>Antiinflamatoria</b>	Apigenina, crisina, gosipina, hibrifolina, hipolaetina-8- $\beta$ -D-glucósido, luteolina, miricetina, nepetina, quercetina, quercitrina, rutina, sidertoflavonona
<b>Antiosteoporótica</b>	Ipriflavona
<b>Antiespasmódica</b>	Apigenina, crisina, kaenferol, quercetina
<b>Antiulcerosa</b>	Hipolaetina-8-glucósido, kaenferol, quercetina, rutina, solona, naringina
<b>Protector Vascular</b>	Antocianidina, citrina, rutósido

En la **tabla 7**, se observa la distribución de algunos tipos de flavonoides aislados de especies de género *Croton*<sup>23</sup>.

**Tabla 7. Distribución de flavonoides en algunas especies del género *Croton*<sup>23</sup>**

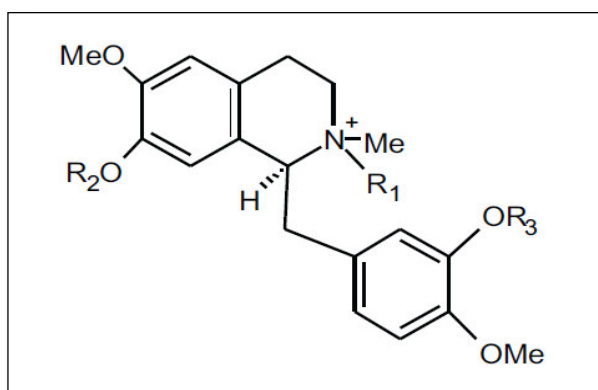
Núcleo	Especie	Parte	Compuestos aislados	País	Actividad biológica
Flavonoles Quercetina	<i>C. oblongifolius</i>	Aérea	Quercetina	Tailandia	Vasorrelajante <sup>48,49</sup>
	<i>C. glabellus</i>		3,4' 7 - tri-O-Metilquercetina.	Colombia	
	<i>C. sciedeanus</i>				
	<i>C. schiedeanus</i>		3,7-di-O-metilquercetina 3-O-metilquercetina	Colombia	
	<i>C. oblongifolius</i>		3' -O-metilquercetina		
Flavonoles glicosidados	<i>C. glabellus</i>		3,3-O- L-ramnosidoquercetina		No reportado
	<i>C. schiedeanus</i>				
	<i>C. bonplandiarus</i>			India	
	<i>C. panamensis</i>			Costa Rica	
	<i>C. oblongifolius</i>	Látex			Antihipertensivo <sup>48</sup>
		aérea	3- D-galactosido quercetina	Ecuador	
	<i>C. menthodorus</i>		3-O- rutinosido quercetina	Ecuador	
Kaempferol					
	<i>C. cajucara</i>	aérea	3,7-di-O-metilkaempferol 3,4' 7-tri-O-metilkaempferol	Brasil	Vasorrelajante <sup>48,50</sup>
	<i>C. pyramidalis</i>		4' ,7-di-O-metilkaempferol	México	
			3-O-rutinosidokaempferol 3-O-(2-O-trans-p-cumaroil)-β d-glucopiranosidokaempferol	Desconocido	
	<i>C. menthodorus</i>				
Miricitina	<i>C. panamensis</i>	Látex	3-O-ramnosidomiricitina	Desconocido	No reportado <sup>48</sup>
	<i>C. draco</i>				
Flavonoles simples	<i>C. lechleri</i>	Látex	(+) -catequina	Ecuador	
	<i>C. panamensis</i>			Desconocido	
	<i>C. urucurana</i>	Corteza		Brasil	
	<i>C. lechleri</i>	Látex	(-) -epicatequina	Desconocido	
	<i>C. panamensis</i>				
	<i>C. lechleri</i>				
	<i>C. draconoides</i>		(+) -galocatequinas	Perú	
	<i>C. panamensis</i>				
	<i>C. urucurana</i>	Corteza		Desconocido	
	<i>C. lechleri</i>	Látex	(-) -epigallocatequina		Actividad antiviral <sup>48</sup>
	<i>C. lechleri</i>				
Flavonoles	<i>C. draconoides</i>		3,3',5,5'7-pentahidroxiflavano	Desconocido	Actividad Antiviral <sup>48</sup>
	<i>C. panamensis</i>				

### 2.5.2. Alcaloides

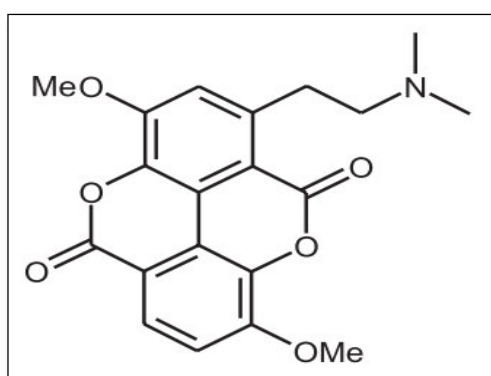
El látex o “sangre de grado” es usada en forma tradicional desde tiempo muy antiguo y en la actualidad se ha demostrado sus propiedades medicinales, como cicatrizante, antiviral, antiinflamatorio, anticancerígeno y probablemente su actividad antitumoral, etc, por el contenido del alcaloides como la taspina, la 4,0, metilcedrusia, 3'4'0, dimetilcedrusina, y el principio SP-303, una proantocianidina oligomérica<sup>29</sup>.

Quimiotaxonómicamente las plantas de la familia Euphorbiaceae, y del género *Croton*, biosintetizan alcaloides provenientes de la L-tirosina, destacando los alcaloides del tipo bencilisoquinolínico (**Figura 7**)<sup>12, 30</sup>.

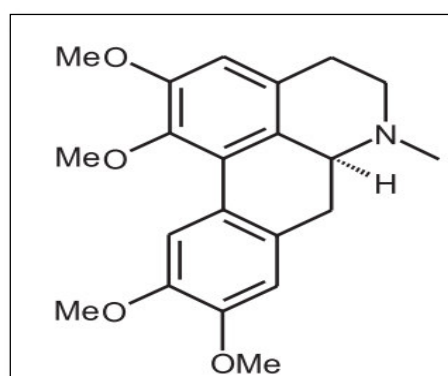
Del género *Croton* se han aislado alcaloides del tipo aporfínico: glaucina y la taspina (**Figura 8 y Figura 9**)<sup>29</sup>, quinoleínas y tropanos<sup>6, 23</sup>.



**Figura 7. Núcleo bencilisoquinolínico<sup>12</sup>**



**Figura 8. Taspina<sup>6</sup>**



**Figura 9. Glaucina<sup>6</sup>**

### 2.5.3. Terpenoides

La mayoría de los componentes de los aceites esenciales extraídos a partir de especies aromáticas pertenecen al grupo de los terpenoides.

El género *Croton* (Euphorbiaceae), del cual se reportan varios usos interesantes en la medicina tradicional, se destaca la presencia de compuestos de tipo terpeno (monoterpenoide, terpenoides, diterpenos de tipo labdano). Entre los componenetes minoritarios presentes en el látex se encuentran los diterpenos como ácido hardwickiico, bicantriol, crolequinol, ácido crolequínico, korberina A y korberina B<sup>23</sup>.

Los principales compuestos terpenoides que se encuentran frecuentemente en los aceites de *Croton* son el linalol, el 1,8-cineol,  $\beta$ -elemeno,  $\alpha$ -copaeno, germacreno D, epi- $\alpha$ -cadinol, cubenol, epi-cubenol, (E)-caryophyllene, selin-11-en-4 $\alpha$ -ol, óxido de cariofileno, spathulenol and  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -eudesmo<sup>31</sup>.

Algunos diterpenos tienen propiedades antihipertensivas, antiagregante plaquetaria, antiinflamatorias, analgésicas, gastroprotectivas, entre otras<sup>27</sup>.

**Tabla 8. Porcentaje de monoterpenos y sesquiterpenos en diferentes especies del género *Croton*<sup>31</sup>**

Constituents	<i>C. campestris</i>	<i>C. chaetocalyx</i>	<i>C. eriocladus</i>	<i>C. glandulosus</i>
Monoterpene hydrocarbons	3.3	0.9	0.5	0.5
Oxygenated monoterpenes	1.3	0.1	0.2	1.0
Sesquiterpene hydrocarbons	83.0	63.4	85.1	55.3
Oxygenated sesquiterpenes	7.2	27.6	7.7	33.2
Other (phenylpropanoids)				1.8
<b>Total</b>	<b>94.8</b>	<b>92.0</b>	<b>93.5</b>	<b>91.8</b>

### 2.6. Actividad antioxidante

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas.

El sistema de defensa antioxidante está constituido por compuestos de naturaleza enzimática como: superóxido dismutasa, catalasa, glutathion

peroxidasa, y compuestos de naturaleza no enzimática como: vitamina E, beta-caroteno, vitamina C, glutatión reducido, albúmina, compuestos fenólicos, flavonoides y metales de transición como Se, Cu, Zn, entre otros<sup>17, 32</sup>.

Los alimentos, al igual que las células del organismo humano, también pueden generar radicales libres; sin embargo también pueden contener sustancias antioxidantes y ejercer una actividad antioxidante, al igual que las plantas medicinales<sup>17</sup>.

## **2.7. Actividad antibacteriana**

La actividad antimicrobiana de los extractos vegetales y productos naturales ha revelado el potencial de las plantas superiores como fuente de agentes anti-infectivos, permitiendo de esta manera un avance al uso empírico de las especies vegetales medicinales con una base científica<sup>1</sup>.

La funcionalidad antibacteriana estaría asociada al conjunto de metabolitos presentes en el género *Croton*, fundamentalmente a los de naturaleza alcaloide. Cabe anotar que los alcaloides poseen un abanico amplio de actividades farmacológicas de gran interés terapéutico, y se distinguen porque dicha actividad es significativa en dosis bajas<sup>33</sup>.

Los extractos de especies de *Croton* pueden usarse como un medio alternativo para tratar infecciones bacterianas y podría ser posible usar como adyuvante en terapia antibiótica contra infecciones bacterianas patógenas<sup>8</sup>.

Estudios *in vitro* han demostrado que la sangre de grado tiene efecto inhibidor del crecimiento de *Escherichia coli*. Otros estudios han mostrado que la sangre de grado tiene efecto positivo en el tratamiento de las úlceras gástricas y la gastritis, esta actividad curativa estaría relacionada con el efecto cicatrizante del Clorhidrato de Taspina (alcaloide), producto de la estimulación en la migración de los fibroblastos. Esta propiedad cicatrizante podría ser complementada con la actividad antibacteriana que conllevaría a la disminución o erradicación de *Helicobacter pylori*, con lo que se eliminaría la alteración producida a nivel de la mucosa gástrica por la colonización de la bacteria<sup>34</sup>.

### **III. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1. Materiales, equipos y reactivos**

##### **3.1.1. Material Biológico**

- Hojas en polvo de *Croton thurifer* Kunth
- Hojas en polvo de *Croton collinus* Kunth
- Cepas de bacterias ATCC: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

##### **3.1.2. Materiales**

- Fracos de color ámbar (capacidad 5 L)
- Papel filtro Whatman N° 1
- Cuba cromatográfica
- Cromatofolios con silicagel GF 254
- Capilares para cromatografía
- Beakers de vidrio (20 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL)
- Tubos de ensayo
- Fioles de vidrio (5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL)
- Micropipetas (20 µL – 100 µL, 200 µL – 1000 µL, 1000 µL – 5000 µL)
- Probetas de vidrio (50 mL, 100 mL, 250 mL)
- Pipetas (5 mL, 10 mL)
- Baguetas de vidrio
- Embudos de vidrio
- Picetas
- Viales
- Placas petri de vidrio
- Pipetas pasteur
- Tips
- Microplacas estériles de poliestireno de 96 pozos (BRAND)
- Celdas de cuarzo

### **3.1.3. Equipos**

- Molino de cuchillas (Thomas Wiley Mill N° 3)
- Estufa (HV Ovens)
- Balanza analítica (Acculab)
- Rotavapor (Buchi B-490)
- Espectrofotómetro UV-Visible (GENESYS 6 UV-VIS-Thermo Scientific)
- Vórtex (Scilogex).

### **3.1.4. Reactivos**

- Etanol 96 °
- Metanol absoluto (Merck)
- Ácido clorhídrico concentrado (J.T.Baker)
- Diclorometano (Merck)
- Éter etílico (Merck)
- Agua destilada
- Reactivo Liebermann Burchard
- Reactivo Shinoda
- Reactivo Dragendorff
- Ácido 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (Sigma-Aldrich, USA)
- Dimetilsulfóxido (Merck)
- Agar tripticasa soya (Merck)
- Agar Mueller Hinton (Merck)
- Resazurina (Sigma-Aldrich, USA).

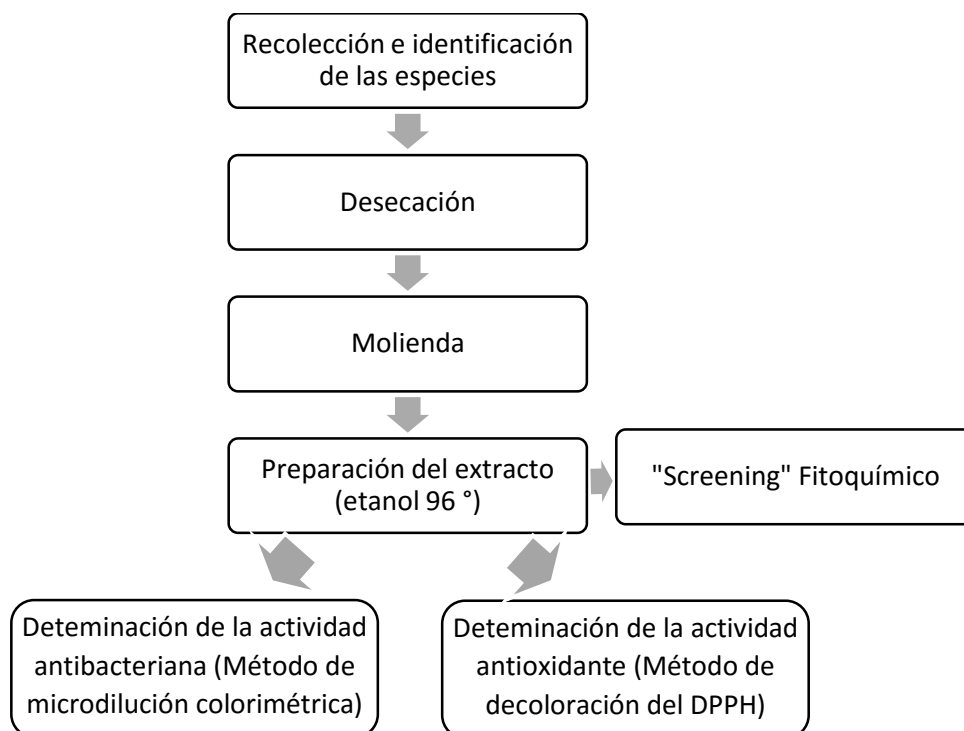
### **3.2. Instalaciones donde se realizó la investigación**

El presente trabajo de investigación se desarrolló entre los meses de agosto 2016 y diciembre 2016 en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. En los laboratorios del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales Juan de Dios Guevara se realizó la obtención del extracto etanólico por el método de macerado, el “screening” fitoquímico y la determinación de la actividad antioxidante; y la investigación de la actividad antibacteriana se desarrolló en el Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo”.

### 3.3. Metodología

El presente trabajo de investigación es un estudio observacional, descriptivo, prospectivo, transversal<sup>35, 36</sup>.

#### 3.3.1. Flujograma del trabajo experimental



**Figura 10. Diagrama de flujo de la metodología**

#### 3.3.2. Recolección e Identificación de las especies

La muestra de *Croton collinus* Kunth fue recolectada en el Distrito de Cumba, Provincia de Utcubamba, Departamento de Amazonas y la muestra de *Croton thurifer* Kunth fue recolectada en el Distrito de Bagua Grande, Provincia de Utcubamba, Departamento de Amazonas por el Biólogo José Campos de la Cruz. La clasificación taxonómica fue realizada por el Biólogo José Campos de la Cruz (**Anexo 1 y Anexo 2**).



### 3.3.3. Desección

Las hojas frescas de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth fueron seleccionadas y posteriormente desecadas a una temperatura no mayor de 30 °C, hasta peso constante.

### 3.3.4. Molienda

Las hojas secas de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth fueron reducidas en partículas finas mediante el molino de cuchillas y almacenado en un lugar fresco.

### 3.3.5. Preparación del extracto

Las hojas, en polvo, de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth se sometieron a maceración con etanol de 96 ° por 7 días, con constante agitación y protegidos de la luz en un frasco ámbar de boca ancha. Luego los extractos fueron filtrados con papel filtro Whatman N° 1, el líquido filtrado se guardó y el residuo fue macerado nuevamente con etanol 96 ° por 2 días. Luego del tiempo establecido se filtró el nuevo extracto y adicionó al líquido anteriormente obtenido en frascos de color ámbar; la cantidad de materia prima y etanol 96 ° utilizados en la extracción por maceración se indican en la Tabla 9.

**Tabla 9. Materia prima y el solvente etanol 96 ° utilizados en la maceración**

	<b>Materia prima (g)</b>	<b>Etanol 96 °(L) en la primera maceración</b>	<b>Etanol 96°(L) en la segunda maceración</b>
<i>Croton thurifer</i> Kunth	100	1.850	0.5
<i>Croton collinus</i> Kunth	101	2.500	0.5

Los extractos obtenidos fueron concentrados a presión reducida por medio del rotavapor<sup>37</sup> y las soluciones resultantes se llevaron a evaporación por calor seco en estufa a una temperatura no mayor a 40 °C hasta su completa evaporación.

### 3.3.6. “Screening” fitoquímico

El “screening” fitoquímico se realizó mediante las reacciones conocidas de coloración y precipitación de grupos funcionales<sup>38</sup>.

**3.3.6.1. Reacción de Shinoda:** Se agregó carbón activado sobre cada extracto de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth previamente resuspendidos con metanol debido a que la coloración del extracto era muy oscura, se filtró con papel filtro Whatman N° 1, al filtrado se le colocó granallas de magnesio y unas pocas gotas de ácido clorhídrico concentrado. El desarrollo inmediato de coloración fue indicativo de la presencia de flavonas (amarillo a rojo), flavanoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo); isoflavanonas, chalconas y auronas no generan coloración.

**3.3.6.2. Reacción de Dragendorff por CCD:** Se resuspendió cada extracto de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth con éter etílico y se sembraron en placas de Silicagel GF 254, las placas se dividieron en tres partes, donde se sembró 10 gotas, 20 gotas y 30 gotas respectivamente. Las placas se colocaron en una cuba cromatográfica con sistema de solventes cloroformo: metanol (2:10) v/v y se revelaron con reactivo de Dragendorff. Las manchas de color naranja indicaron la presencia de alcaloides.

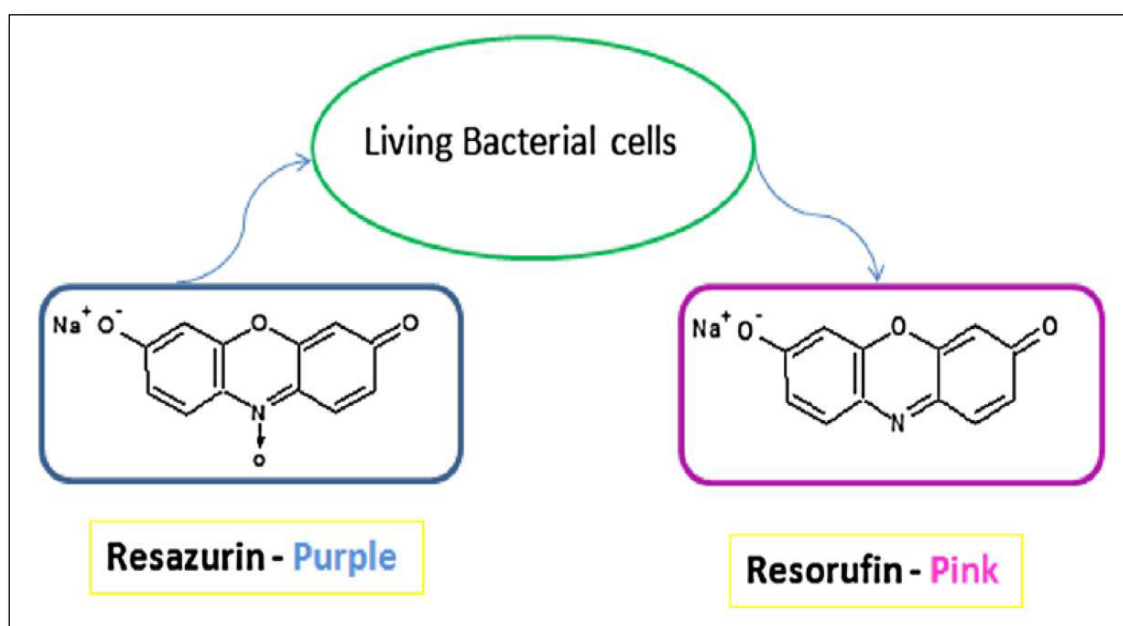
**3.3.6.3. Prueba afrosimétrica:** Se resuspendió cada extracto de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth en 1 mL de agua destilada, se agitó. La presencia de espumas de manera permanente por 1 ó 2 minutos indicó la presencia de saponinas.

**3.3.6.4. Reacción de Liebermann Burchard:** A cada extracto seco de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth se le añadió unas gotas de ácido acético y 3 mL de anhídrido acético:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50:1) v/v previamente enfriados en hielo. Las saponinas triterpenoidales dan un color rosado o púrpura mientras las esteroidales dan un color azul-verdoso.

### 3.3.7. Determinación de la actividad antibacteriana

#### 3.3.7.1. Método de microdilución colorimétrica

**3.3.7.1.1. Fundamento:** La resazurina es un colorante redox de color púrpura que se usa comúnmente como indicador en varios ensayos de citotoxicidad<sup>39, 40</sup>. Las células bacterianas activas reducen la resazurina no fluorescente (púrpura) a la resorufina fluorescente (rosado), que puede reducirse adicionalmente a hidroresorufina (**Figura 11**), dando una medida cuantificable directa de la actividad metabólica bacteriana. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se define como la concentración más baja de agente antimicrobiano que previene el crecimiento visible de bacterias en condiciones de crecimiento definidas, y se detecta a simple vista por el impedimento de cambio de color de la resazurina <sup>41</sup>.



**Figura 11. Reducción de resazurina<sup>41</sup>**

#### 3.3.7.1.2. Procedimiento<sup>39</sup>:

##### a) Preparación de las muestras

Cada extracto de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth se diluyó con DMSO a una concentración de 200 mg/mL, posteriormente se diluyeron con caldo Mueller Hinton a una proporción de 1/50 y se prepararon diluciones dobles seriadas, obteniendo 10 diluciones doblemente concentradas finales en el rango de 7,8 – 4000 µg/mL de los extractos trabajados.

#### **b) Preparación de los inóculos bacterianos**

Las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 fueron reactivadas en caldo tripticasa soya e incubadas a 37 °C por 4 horas, posteriormente fueron sembradas en placas de agar tripticasa soya e incubadas a 37 °C por 18 - 24 horas. Las colonias se resuspendieron en solución salina estéril 0.85 % y se ajustó la turbidez semejante al tubo 0.5 de la escala de McFarland que equivale a  $1,5 \times 10^8$  ufc/mL. En seguida se realizó una doble dilución de 1:30 y de 1:5 con caldo Mueller Hinton, para obtener un inóculo de  $1,5 \times 10^5$  ufc/mL.

#### **c) Preparación del control para la prueba de microdilución**

El control positivo utilizado para la prueba fue ciprofloxacino. El ciprofloxacino fue preparado a una concentración de 64 µg/mL en agua destilada y se prepararon diluciones seriadas con caldo Mueller Hinton, obteniendo 10 diluciones en el rango de 0,125 – 64 µg/mL.

#### **d) Preparación del inóculo con el indicador resazurina**

Por cada 2 mL de inóculo se agregó 10 µL de resazurina 20 mg/mL.

#### **e) Sembrado en las placas**

La prueba de microdilución fue realizada en microplacas estériles de poliestireno de 96 pozos de fondo plano y estériles. La distribución de las muestras se realizó teniendo en cuenta el diseño de la bandeja de microdilución<sup>42</sup> (**Anexo 3**). En los pozos correspondientes a las muestras se colocó 100 µl de la dilución 2x, estas diluciones tuvieron un rango de concentración entre 3,91 – 2000 µg/mL, y 100 µL del inóculo con resazurina, en los pozos correspondientes al control de esterilidad se colocó 100 µL de resazurina con 100 µL de caldo Mueller Hinton, en los pozos correspondientes al control de crecimiento se colocó 100 µL de inóculo con resazurina más 100 µL de caldo Mueller Hinton, en los pozos correspondientes al control positivo de ciprofloxacino se colocaron las 10 diluciones seriadas con caldo Mueller Hinton en el rango de 0,125 – 64 µg/mL. Las microplacas se incubaron a 37 °C por 24 horas.

### f) Lectura de los resultados

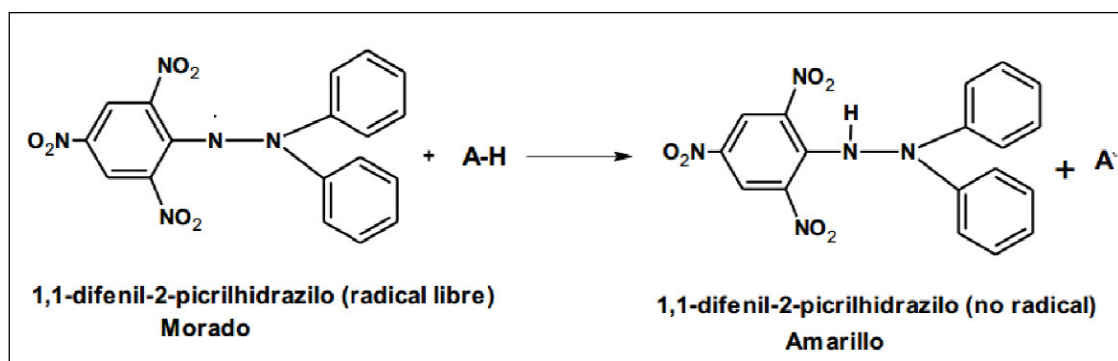
La lectura de los resultados se realizó visualmente, cualquier cambio de color de púrpura a rosado se registró como crecimiento positivo. La concentración más baja a la que no se produjo el cambio de color se tomó como el valor de la CMI.

### 3.3.8. Determinación de la actividad antioxidante

#### 3.3.8.1. Método de decoloración del radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH)

##### 3.3.8.1.1. Fundamento

El 2,2-difenil-1-picril hidrazilo es un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo que la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de radicales libres<sup>18,43</sup>. El DPPH es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido en presencia de una sustancia antioxidante (**Figura 12**), el desarrollo del color fue medido espectrofotométricamente a 517nm<sup>17, 44</sup>.



**Figura 12. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante<sup>45</sup>**

##### 3.3.8.1.2. Procedimiento

#### a) Preparación de las muestras

##### -*Croton thurifer* Kunth

Se pesó 6 mg de extracto de *Croton thurifer* Kunth y se enrasó con etanol (solvente soluble) en una fiola de 10 mL, se obtuvo una solución madre de 600 µg/mL, de la cual se prepararon 5 diluciones finales de 75 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL y 6,25 µg/mL (**Tabla 10**). Las diluciones se prepararon por triplicado.

**Tabla 10. Diseño de trabajo para el tratamiento de la muestra de *Croton thurifer* Kunth**

**- Viales**

<b>Solución Madre (Concentración de 600 µg/mL) (mL)</b>	<b>Etanol (mL)</b>	<b>Vol. Final (mL)</b>	<b>Concentración de la muestra (µg/mL)</b>
(C) 1,5	2,5	4	225,0
(D) 1,0	3,0	4	150,0
(E) 0,5	3,5	4	75,00
(F) 0,25	3,75	4	37,50
(G) 0,125	3,875	4	18,75

**- Tubos de ensayo**

<b>Volumen del vial (mL)</b>	<b>DPPH (Concentración de 20 µg/mL) (mL)</b>	<b>Concentración final (µg/mL)</b>
(C) 0,8	1,6mL	75
(D) 0,8	1,6mL	50
(E) 0,8	1,6mL	25
(F) 0,8	1,6mL	12,5
(G) 0,8	1,6mL	6,25

**Leyenda:** (C): M.P. con una concentración final de 75 µg/mL, (D): M.P. con una concentración final de 50 µg/mL, (E): M.P. con una concentración final de 25 µg/mL, (F): M.P. con una concentración final de 12,5 µg/mL, (G): M.P. con una concentración final de 6,25 µg/mL.

**- *Croton collinus* Kunth**

Se pesó 6 mg de extracto de *Croton collinus* Kunth y se enrasó con etanol (solvente soluble) en una fiola de 10 mL, se obtuvo una solución madre de 600 µg/mL, de la cual se prepararon 5 diluciones finales de 200 µg/mL, 100 µg/mL, 75 µg/mL, 50 µg/mL y 25 µg/mL (**Tabla 11**). Las diluciones se prepararon por triplicado.

**Tabla 11. Diseño de trabajo para el tratamiento de la muestra de *Croton collinus* Kunth**

**- Viales**

<b>Solución Madre (Concentración de 600 µg/mL) (mL)</b>	<b>Etanol (mL)</b>	<b>Vol. Final (mL)</b>	<b>Concentración de la muestra (µg/mL)</b>
(A) 4,0	0,0	4	600
(B) 2,0	2,0	4	300
(C) 1,5	2,5	4	225
(D) 1,0	3,0	4	150
(E) 0,5	3,5	4	75,0

**- Tubos de ensayo**

<b>Volumen del vial (mL)</b>	<b>DPPH (Concentración de 20 µg/mL) (mL)</b>	<b>Concentración final (µg/mL)</b>
(A) 0,8	1,6mL	200
(B) 0,8	1,6mL	100
(C) 0,8	1,6mL	75
(D) 0,8	1,6mL	50
(E) 0,8	1,6mL	25

**Leyenda:** (A): M.P. con una concentración final de 200 µg/mL, (B): M.P. con una concentración final de 100 µg/mL, (C): M.P. con una concentración final de 75 µg/mL, (D): M.P. con una concentración final de 50 µg/mL, (E): M.P. con una concentración final de 25 µg/mL.

**b) Preparación del estándar de vitamina C**

Se pesó 2,4 mg de vitamina C y se enrasó con agua destilada en una fiola ámbar de 100 mL, se obtuvo una solución madre con una concentración de 24 µg/mL, de la cual se prepararon 5 diluciones finales de 2,4 µg/mL, 2,0 µg/mL, 1,6 µg/mL, 1,2 µg/mL y 0,8 µg/mL (**Tabla 12**). Las diluciones se prepararon por triplicado.

**Tabla 12. Diseño de trabajo para el tratamiento del estándar de vitamina C**

**- Viales**

<b>Solución Madre (Concentración de 600 µg/mL) (mL)</b>	<b>Agua destilada (mL)</b>	<b>Vol. Final (mL)</b>	<b>Concentración de la muestra (µg/mL)</b>
(A) 1,2	2,8	4	7,2
(B) 1,0	3,0	4	6,0
(C) 0,8	3,2	4	4,8
(D) 0,6	3,4	4	3,6
(E) 0,4	3,6	4	2,4

**- Tubos de ensayo**

<b>Volumen del vial (mL)</b>	<b>DPPH (Concentración de 20 µg/mL) (mL)</b>	<b>Concentración final (µg/mL)</b>
(A) 0,8	1,6mL	2,4
(B) 0,8	1,6mL	2,0
(C) 0,8	1,6mL	1,6
(D) 0,8	1,6mL	1,2
(E) 0,8	1,6mL	0,8

**Leyenda:** **(A):** M.P. con una concentración final de 2,4 µg/mL, **(B):** M.P. con una concentración final de 2,0 µg/mL, **(C):** M.P. con una concentración final de 1,6 µg/mL, **(D):** M.P. con una concentración final de 1,2 µg/mL, **(E):** M.P. con una concentración final de 0,8 µg/mL.

**c) Preparación del patrón de DPPH**

Se pesó 2 mg de DPPH y se enrasó con metanol en una fiola ámbar de 100 mL.

**d) Preparación de los blancos de las muestras**

Para cada concentración final de la muestra se preparó un blanco, al cual se le colocó 0,8 mL de muestra y 1,6 mL de etanol.



#### e) Preparación del blanco del DPPH

Para la preparación del blanco del DPPH se colocó 1,6 mL de DPPH y 0,8 mL de metanol. La muestra se preparó por triplicado.

#### f) Preparación de la batería de tubos

A cada tubo de ensayo de la concentración final de *Croton thurifer* Kunth, *Croton collinus* Kunth y Vitamina C se le adicionó 1,6 mL de DPPH (**Tabla 10, Tabla 11, Tabla 12**), se colocó en la oscuridad por 30 minutos.

#### g) Lectura de los resultados

La lectura de los resultados se realizó en el espectrofómeto UV-Visible a 517 nm. El blanco para calibrar el espectrofotómetro fue: 1,0 mL de metanol y 1,0 mL de agua destilada.

#### h) Cálculo de la IC<sub>50</sub>

Con los valores de absorbancia obtenidos se determinó el porcentaje Captación de Radicales Libres, según la siguiente fórmula<sup>17</sup>:

$$\% \text{ Captación de Radicales Libres} = \frac{Abs_{MP} - Abs_{Blanco de MP}}{Abs_{DPPH}} \times 100$$

La concentración máxima de la media inhibitoria (IC<sub>50</sub>) se determinó mediante una ecuación de la recta, en donde el eje de abcisas fue la concentración final de la muestra, y el eje de coordenadas fue el % Captación de Radicales Libres. La IC<sub>50</sub> se define como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial<sup>18</sup> de DPPH al 50 %.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. “Screening” fitoquímico

Los resultados del “Screening” fitoquímico de los extractos etanólicos de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth se presentan en las tablas 13 al 15.

El análisis fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Croton thurifer* Kunth (**Tabla 13**) reveló leve presencia de alcaloides, presencia moderada de saponinas y abundante cantidad de esteroides y flavonoides.

El análisis fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Croton collinus* Kunth (**Tabla 14**) reveló presencia muy abundante de flavonoides y alcaloides, abundante presencia de esteroides; asimismo presencia leve de saponinas.

La Tabla 15 muestra comparativamente los diferentes metabolitos presentes en los extractos etanólicos de las hojas de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth.

**Tabla 13. Marcha fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de *Croton thurifer* Kunth**

Reacción	Metabolitos Secundarios	Resultado	<i>Croton thurifer</i> Kunth
Reacción de Shinoda	Isoflavanonas, chalconas, auronas	Coloración naranja	+++
Reacción de Dragendorff por CCD	Alcaloides	Manchas de color naranja	+
Prueba afrosimétrica	Saponinas	Presencia de espuma	++
Reacción de Liebermann Burchard	Esteroides	Coloración azul verdoso	+++

Leyenda:

Muy abundante: ++++    Abundante: +++    Moderado: ++    Leve: +    Ausente: -

**Tabla 14. Marcha fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de *Croton collinus* Kunth**

Reacción	Metabolitos Secundarios	Resultado	<i>Croton collinus</i> Kunth
Reacción de Shinoda	Flavonas flavanonoles, flavanonas	Coloración roja	++++
Reacción de Dragendorff por CCD	Alcaloides	Manchas de color naranja	++++
Reacción de Agua destilada	Saponinas	Presencia de espuma	+
Reacción de Liebermann Burchard	Esteroides	Coloración azul verdoso	+++

**Leyenda:**

Muy abundante: ++++    Abundante: +++    Moderado: ++    Leve: +    Ausente: -

**Tabla 15. Comparación de los diferentes metabolitos presentes en los extractos etanólicos de las hojas de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth**

Especies de planta	Flavonoides	Alcaloides	Saponinas	Esteroides
<i>Croton thurifer</i> Kunth	+++	+	++	+++
<i>Croton collinus</i> Kunth	++++	++++	+	+++

**Leyenda:**

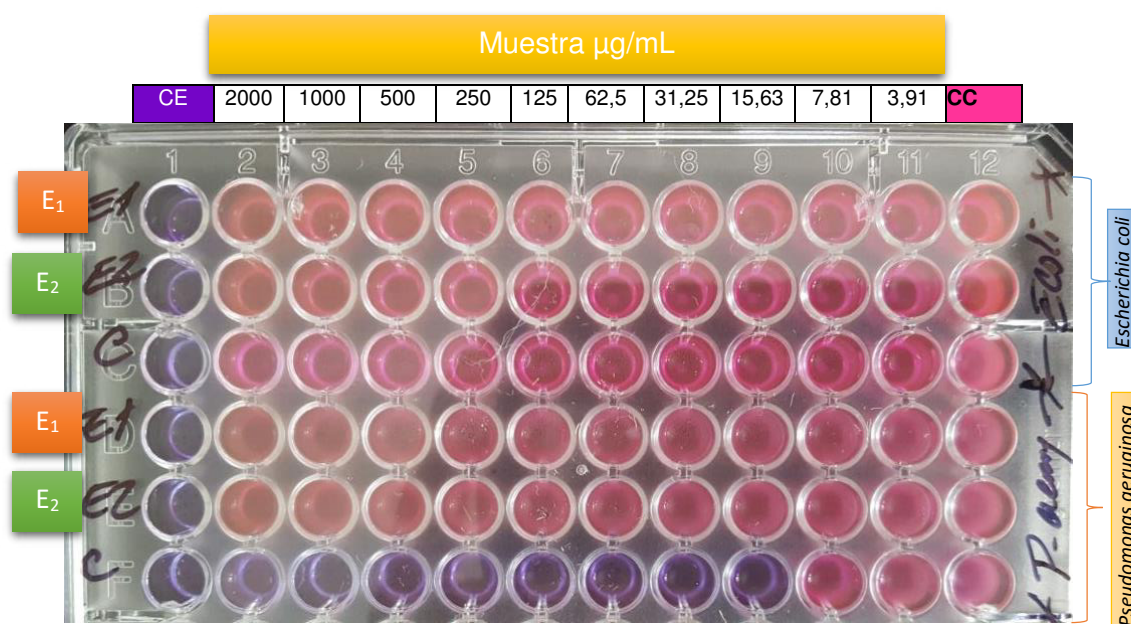
Muy abundante: ++++    Abundante: +++    Moderado: ++    Leve: +    Ausente: -

## 4.2. Actividad antibacteriana

Los resultados de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución colorimétrica de los extractos etanólicos de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth se presentan en las figuras del 13 al 15 y tabla 16.

En la Figura 13, Figura 15 y Tabla 16 se observa que los extractos etanólicos de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth presentan una CMI > 2000 µg/mL contra *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

En las Figuras del 14 al 15 y Tabla 16 se observa que solamente el extracto etanólico de *Croton thurifer* Kunth presenta una CMI = 1000 µg/mL contra *Bacillus subtilis* ATCC 6633, y que el resto de extractos etanólicos de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth presentan una CMI > 2000 µg/mL contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633.



**Figura 13. Placa con 96 pocillos para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólicos de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth contra *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

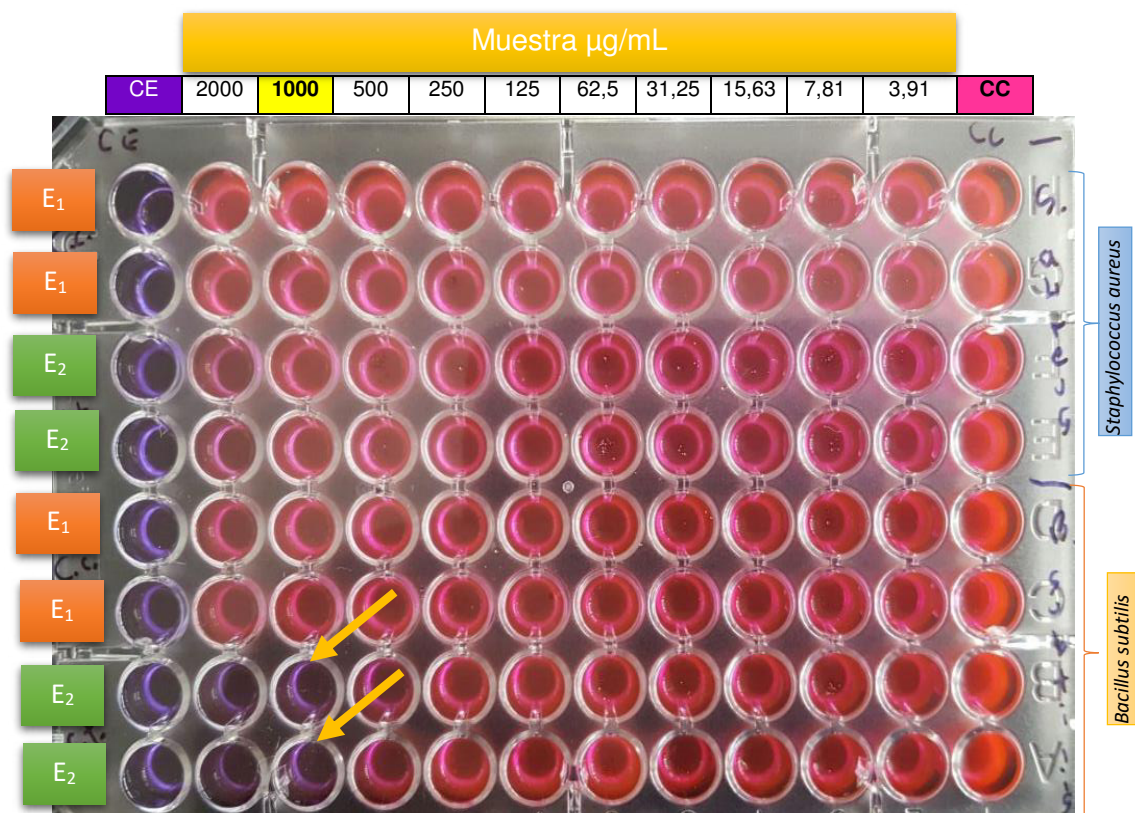
**Leyenda:**

**E1:** *Croton collinus* Kunth

**E2:** *Croton thurifer* Kunth

**CE:** Control de esterilidad

**CC:** Control de crecimiento



**Figura 14. Placa con 96 pocillos para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólicos de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633**

**Leyenda:**

**E1:** *Croton collinus* Kunth

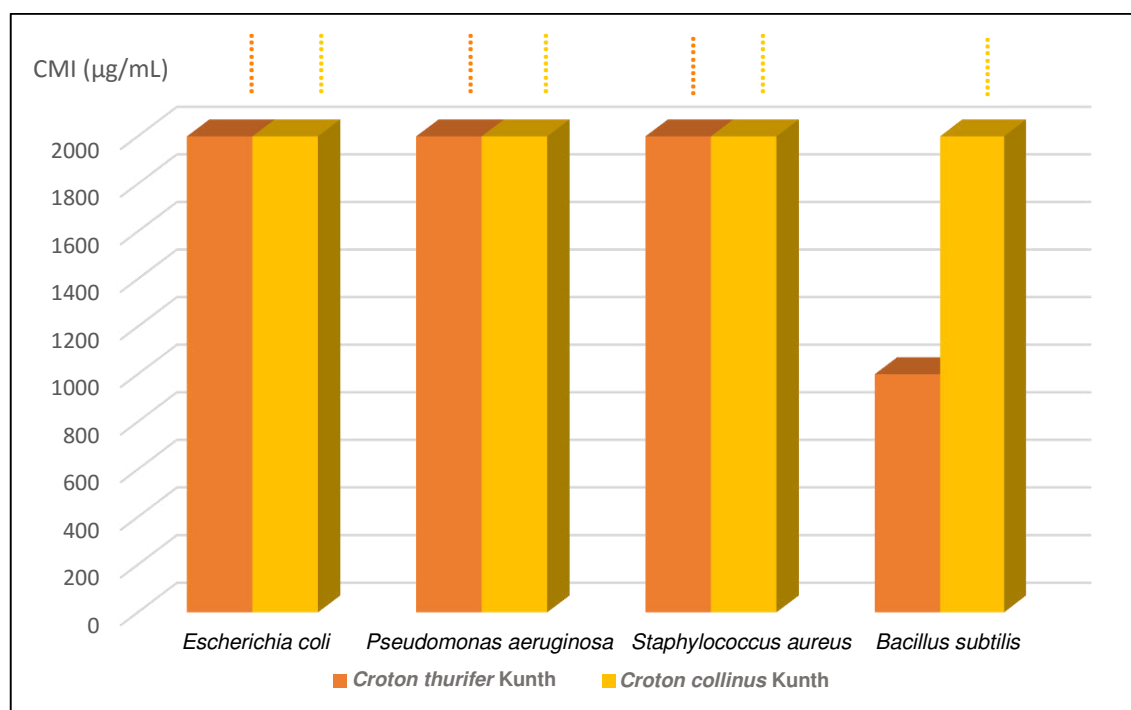
**E2:** *Croton thurifer* Kunth

**CE:** Control de esterilidad

**CC:** Control de crecimiento

**Tabla 16. Valores de la concentración mínima inhibitoria de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa***

Especie de planta	Concentración mínima inhibitoria (µg/mL)			
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<b><i>Croton thurifer</i> Kunth</b>	>2000	>2000	1000	>2000
<b><i>Croton collinus</i> Kunth</b>	>2000	>2000	>2000	>2000



**Figura 15. Comparación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólicos de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth contra *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633**

### 4.3. Actividad antioxidante

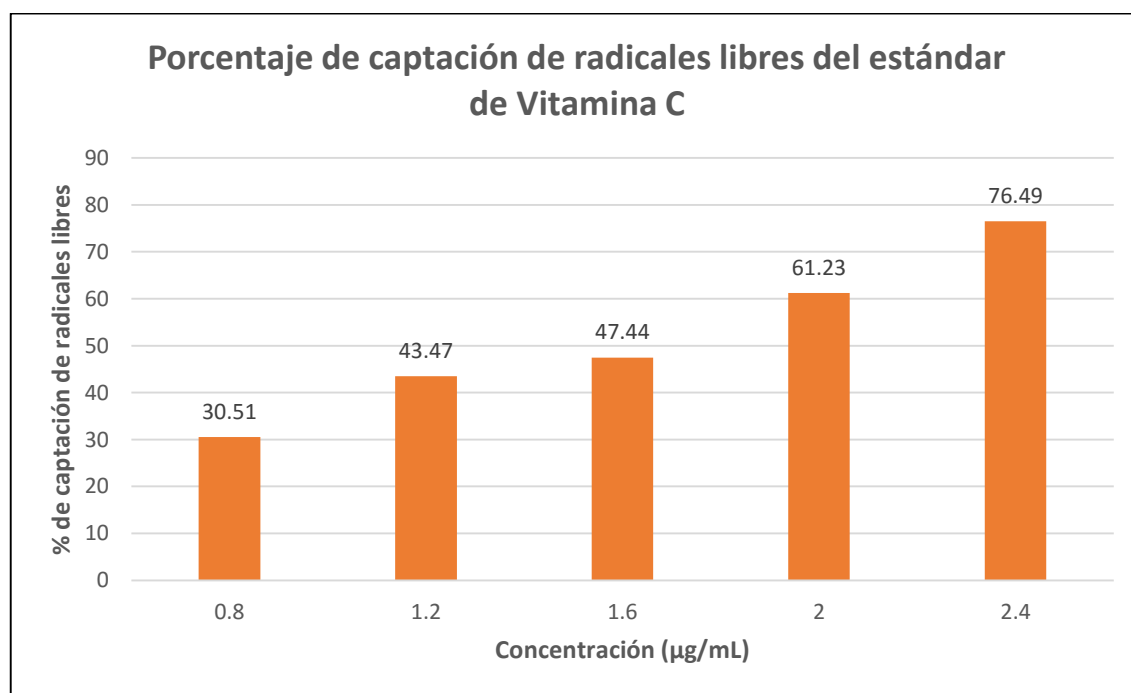
Los resultados de la determinación de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth se presentan en las figuras del 16 al 22 y tablas del 17 al 19.

En las figuras del 16 al 17 y tabla 17, se presentan los resultados de la actividad antioxidante del estándar de vitamina C, mostrando un IC<sub>50</sub> de 1,53 µg/mL.

En las figuras del 18 al 19 y tabla 18, se presentan los resultados de la actividad antioxidante del extracto etanólico de *Croton thurifer* Kunth, mostrando un IC<sub>50</sub> de 28,4 µg/mL.

En las figuras del 20 al 21 y tabla 19, se presentan los resultados de la actividad antioxidante del extracto etanólico de *Croton collinus* Kunth, mostrando un IC<sub>50</sub> de 62,42 µg/mL.

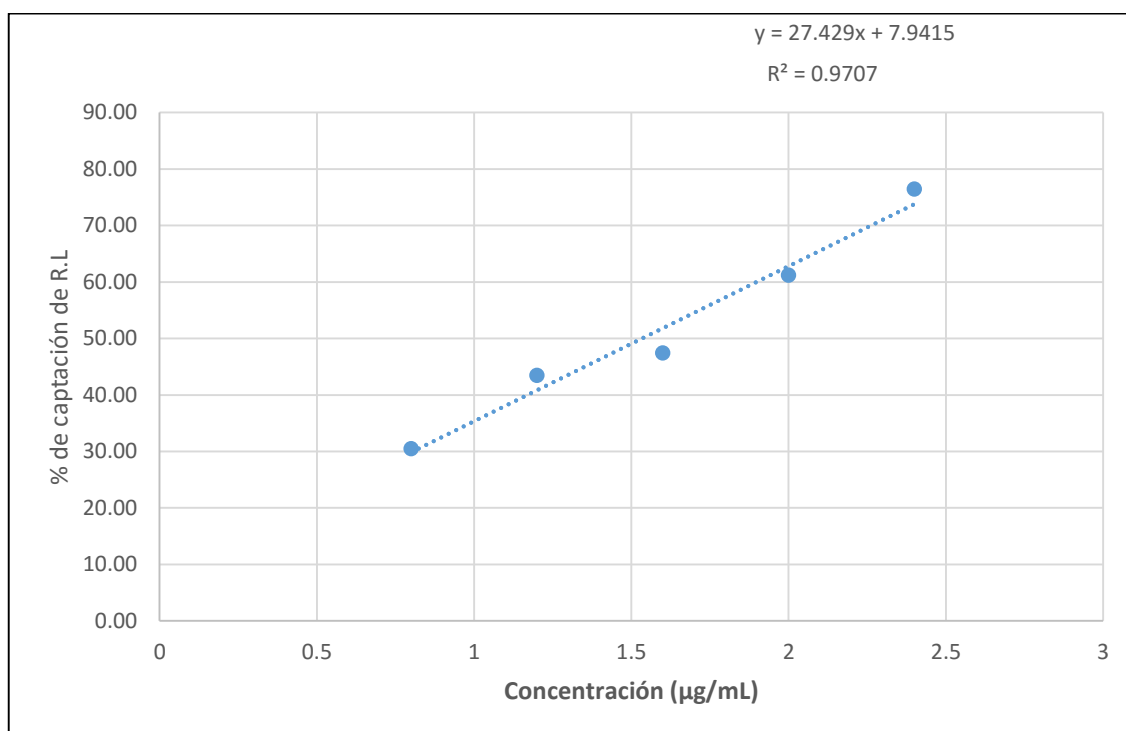
En la figura 22 se presenta los valores de la IC<sub>50</sub> de forma comparativa del estándar de vitamina C, extracto etanólico de *Croton thurifer* Kunth y extracto etanólico de *Croton collinus* Kunth.



**Figura 16. Porcentaje de captación de radicales libres del estándar de Vitamina C, lectura en espectrofotómetro UV-Visible a 517nm**

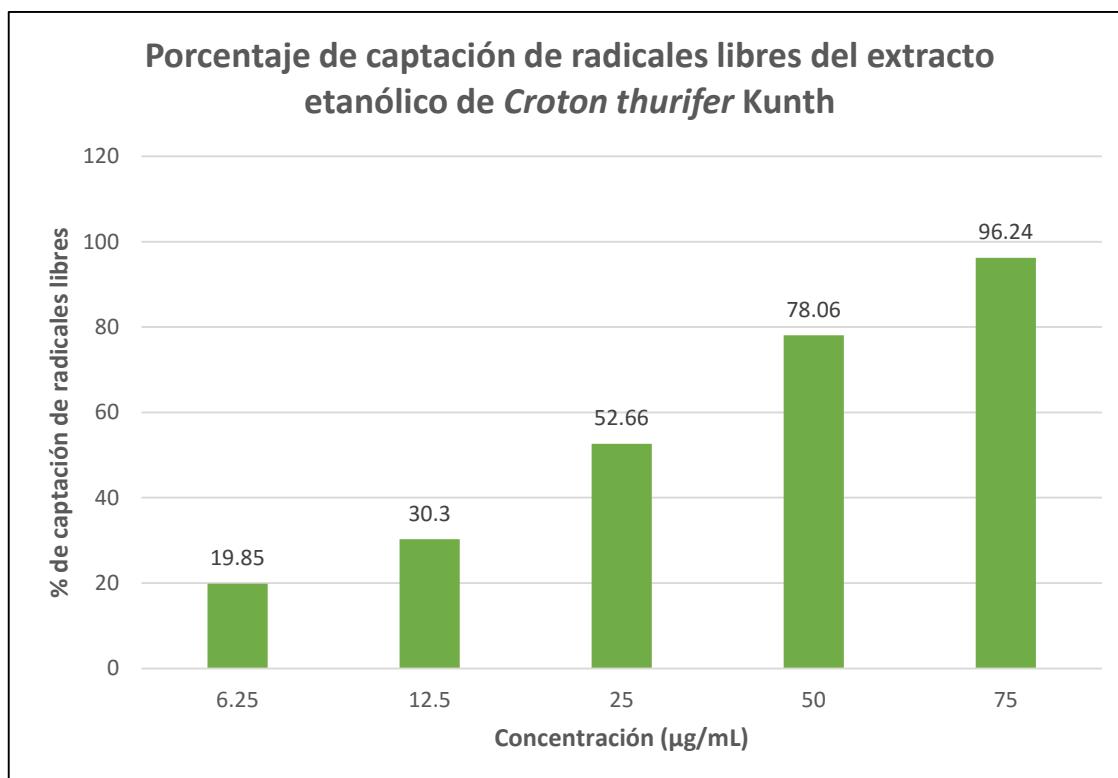
**Tabla 17. Capacidad antioxidante del estándar de Vitamina C**

Concentración (µg/mL)	Promedio de absorbancia a 517 nm	% de captación de R.L del estándar de Vitamina C	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
2,4	0,1125	76,49	1,53
2,0	0,1855	61,23	
1,6	0,2515	47,44	
1,2	0,2705	43,47	
0,8	0,3325	30,51	



**Figura 17. Correlación entre las concentraciones del estándar de vitamina C vs % de captación de radicales libres, lectura en espectrofotómetro UV-Visible a 517nm**

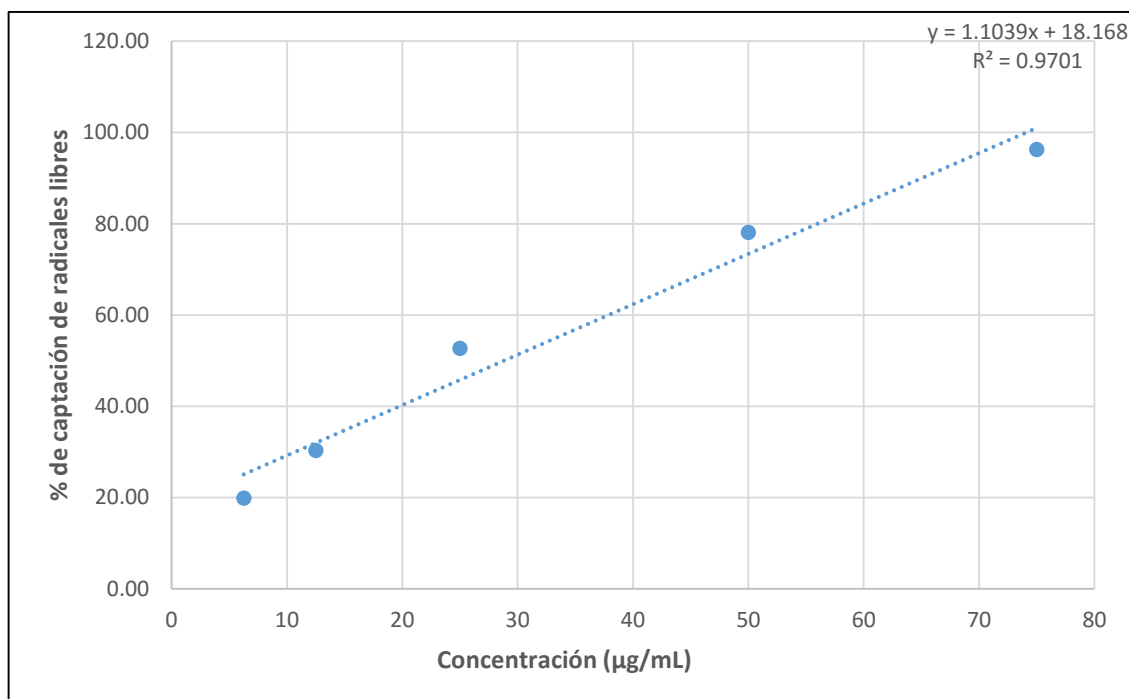




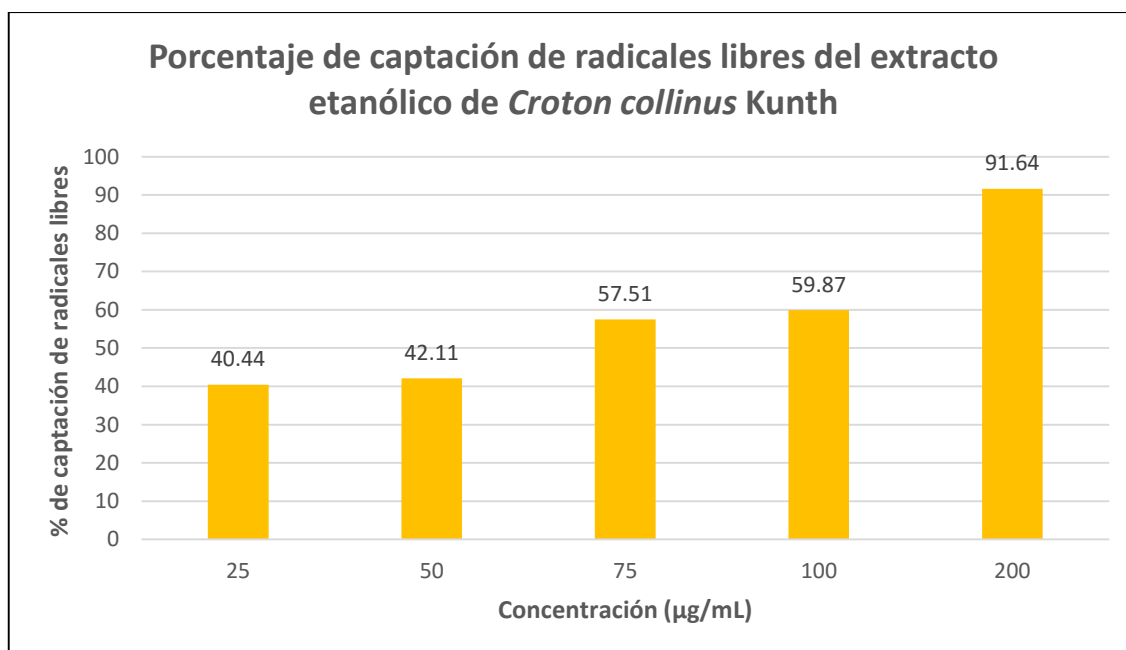
**Figura 18. Porcentaje de captación de radicales libres del extracto etanólico de *Croton thurifer* Kunth, lectura en espectrofotómetro UV-Visible a 517nm**

**Tabla 18. Capacidad antioxidante del extracto etanólico de *Croton thurifer* Kunth**

Concentración (µg/mL)	Promedio de absorbancia a 517 nm	% de captación de R.L extracto etanólico de <i>Croton thurifer</i> Kunth	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
75	0,018	96,24	28,4
50	0,105	78,06	
25	0,2265	52,66	
12,5	0,3335	30,30	
6,25	0,3835	19,85	



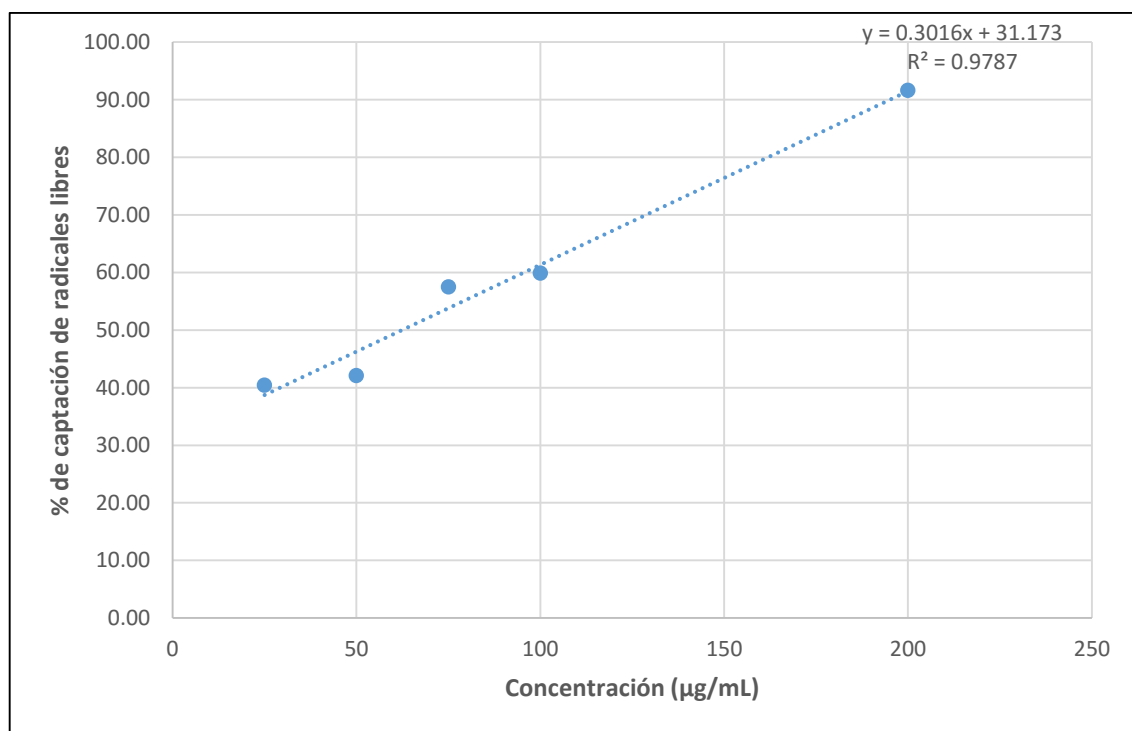
**Figura 19. Correlación entre las concentraciones del extracto etanólico de *Croton thurifer* Kunth vs % de captación de radicales libres, lectura en espectrofotómetro UV-Visible a 517nm**



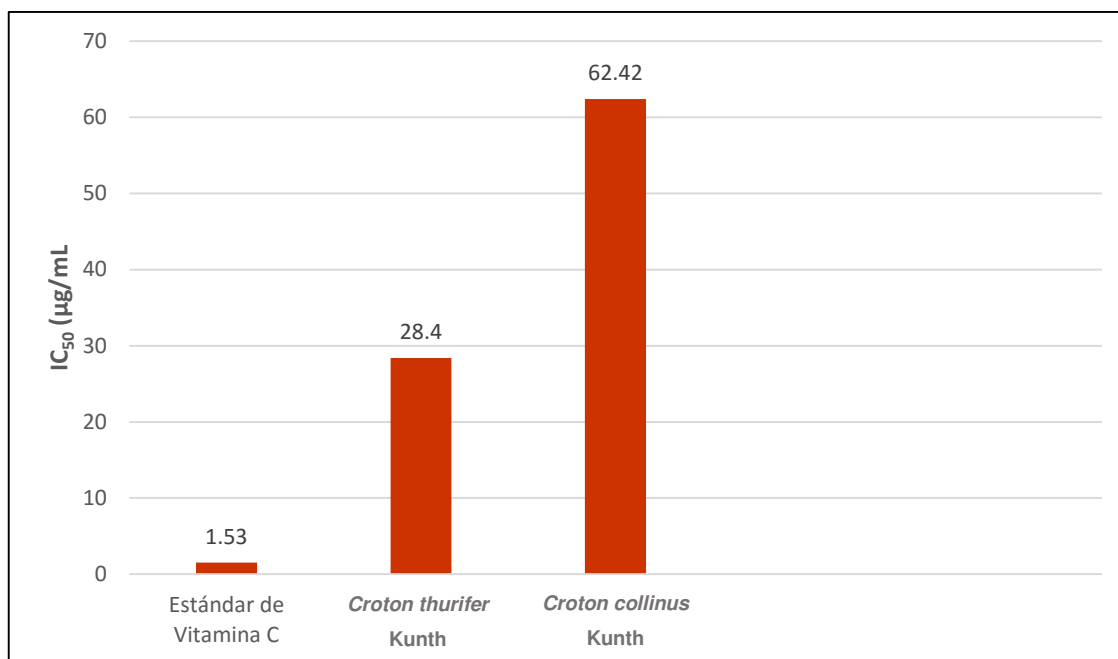
**Figura 20. Porcentaje de captación de radicales libres del extracto etanólico de *Croton collinus* Kunth, lectura en espectrofotómetro UV-Visible a 517nm**

**Tabla 19. Capacidad antioxidante del extracto etanólico de *Croton collinus* Kunth**

Concentración (µg/mL)	Promedio de absorbancia a 517 nm	% de captación de R.L extracto etanólico de <i>Croton collinus</i> Kunth	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
200	0,04	91,64	62,42
100	0,192	59,87	
75	0,2033	57,51	
50	0,277	42,11	
25	0,285	40,44	



**Figura 21. Correlación entre las concentraciones del extracto etanólico de *Croton collinus* Kunth vs % de captación de radicales libres, lectura en espectrofotómetro UV-Visible a 517nm**



**Figura 22. Comparación de la  $IC_{50}$  del estándar de vitamina C, extracto etanólico de *Croton thurifer* Kunth y extracto etanólico de *Croton collinus* Kunth**

## V. DISCUSIÓN

El “screening” fitoquímico de los extractos etanólicos de hojas de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth evidenció presencia de flavonoides, alcaloides, saponinas y esteroides para ambas especies. Estos resultados están acorde con los reportes del género *Croton*, que generalizan como principales metabolitos secundarios a los terpenoides, flavonoides y alcaloides<sup>25</sup>; otros metabolitos detectados en menor medida en este género son aminoácidos, cardenólidos, fenoles simples, proantocianidinas, quinonas y taninos<sup>19</sup>.

Se utilizó el etanol como solvente de extracción debido a que los metabolitos secundarios que se encuentran en cada uno de los extractos tienen propiedades hidrofílicas con el solvente utilizado para su obtención; posiblemente estos metabolitos son responsables de las propiedades farmacológicas de las plantas, y se ve reflejado en la mayor eficacia del extracto utilizado. Corrales et al (2013) demostró que el extracto etanólico de *C. lechleri* presentó un mayor potencial antibacteriano en comparación con el extracto obtenido con éter de petróleo, gracias a su afinidad polar y su mayor cantidad de componentes extraídos que le confieren esta propiedad<sup>46</sup>.

La actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de hojas de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth por el método de microdilución colorimétrica en microplacas demostró que *Croton thurifer* Kunth solo tiene actividad antibacteriana frente a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 con una CMI = 1000 µg/mL. Por otra parte, el extracto etanólico de hojas de *Croton collinus* Kunth no presentó actividad antibacteriana a una concentración ≤2000 µg/mL frente a las bacterias ensayadas; con lo cual se concluye que *Croton thurifer* Kunth presenta mayor actividad antibacteriana en comparación con *Croton collinus* Kunth. En un estudio realizado en las hojas de tres especies de *Croton* por el Método de microdilución en serie contra *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* se demostró que *Croton megalobotrys* presentó actividad contra *Enterococcus faecalis* con un valor de concentración mínima inhibitoria (CMI) de 20 µg/mL, *Croton steenkapianus* presentó una CMI de 625 µg/mL contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Croton*

*salvaticus* fue débilmente activo contra todos los organismos de ensayo a la misma concentración (1250 µg/mL)<sup>47</sup>.

Panda et al (2010) determinó que el extracto etanólico de la corteza y la hoja de *Croton roxburghii* Balak por el método de pozos en agar tiene actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* enteropatógenos y enterotoxigénicos con una CMI que osciló entre 356 y 625 µg/mL<sup>48</sup>. La diferencia entre estos resultados puede deberse a la alta diversidad química del género *Croton*<sup>6</sup>, las condiciones en el momento de la recolección, el tipo de extracto utilizado, la parte de la planta empleada en el estudio, la metodología utilizada para evaluar la actividad antibacteriana, la dosis y la cepa bacteriana<sup>49,50</sup>.

La presencia de flavonoides, alcaloides, saponinas y esteroides visualizados en el “screening” fitoquímico pueden ser los responsables de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *Croton thurifer* Kunth. Estudios indican que los taninos, saponinas, antraquinonas, glicósidos y alcaloides pueden haber sido los compuestos activos en los extractos metanólicos de *C. zambesicus* contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus subtilis*<sup>8</sup>. A pesar que la actividad antibacteriana no se encuentra muy comúnmente en alcaloides, algunas especies del género *Croton* presentan dicha actividad, sin embargo aún se plantea es la necesidad de confirmar el mecanismo de acción de este tipo de compuestos<sup>51</sup>. En respuesta a infecciones microbianas, los flavonoides de las plantas forman complejos con proteínas de células bacterianas e interfieren con las actividades de la célula en el proceso de adhesión bacteriana. Las acciones de algunas flavanonas pueden provocar la ruptura de la membrana plasmática bacteriana<sup>52</sup>. Las actividades antibacterianas terpénicas aparecen en diferentes formas: sesquiterpenos, tetraterpenos, diterpenos o triterpenos<sup>53,54</sup>.

En el estudio se observó mayor sensibilidad por las bacterias Gram positivas que las Gram negativas, reportes indican que esta diferencia se centra en la estructura de las membranas y la pared celular bacteriana tanto a nivel morfológico como fisiológico; adicional a estas dos estructuras, las bacterias

Gram negativas poseen una membrana externa responsable de cierto grado de resistencia frente a los agentes antibacterianos. Las paredes celulares de las bacterias Gram negativas contienen peptidoglucano, lipoproteína exterior y lipopolisacáridos las cuales emergen hasta la superficie bacteriana, en general, esta es permeable sin selectividad específica. Sin embargo, la membrana externa es semipermeable, por lo que restringe el paso de moléculas relativamente grandes, como es el caso de los metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos y de éter de petróleo<sup>46</sup>.

El método de microdilución colorimétrica en microplacas es estandarizado, preciso, de bajo costo, fácil de llevar a cabo y puede utilizarse con éxito para evaluar las propiedades antibacterianas de los productos naturales<sup>39, 41</sup>, por lo que las principales ventajas de este método son la reproducibilidad, la economía de los reactivos y el espacio que se produce debido a la miniaturización de la prueba<sup>55</sup>; además la adición de colorante resazurina como indicador redox, supera los problemas asociados con materiales de ensayo escasamente solubles y tiene la ventaja de no ser tóxico<sup>56</sup>. A pesar que este método tiene los estándares más reconocidos proporcionados por el CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) y el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST), es conocido que el tamaño del inóculo, el tipo de medio de crecimiento, el tiempo de incubación y el método de preparación del inóculo puede influir en los valores de CMI<sup>55</sup>.

En cuanto la actividad antioxidante de las especies en estudio mediante el método del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), el extracto etanólico de hojas de *Croton thurifer* Kunth presentó una mayor IC<sub>50</sub>, con un valor de 28,4 µg/mL, en comparación con el extracto etanólico de hojas de *Croton collinus* Kunth que mostró un IC<sub>50</sub> de 62,42 µg/mL, sin embargo ninguna de las especies mostró una mayor actividad antioxidante que la vitamina C, que presentó una IC<sub>50</sub> de 1,53 µg/mL. Otro estudios reportan valores similares de IC<sub>50</sub> para ácido ascórbico, con un valor de 1,72 ± 0,046 µg/mL<sup>57</sup>.

Las especies del género *Croton* son ricas en flavonoides, particularmente flavonas y flavonoles que se pueden presentar como *O*- y *C*- glicósidos, metil ésteres o polihidroxilados. De la corteza de la especie *Croton celtidifolius* se aisló el flavonoide quercetina que presenta actividad antioxidante y antiinflamatoria; otros flavonoides encontrados en las especies del género *Croton* son: canferol, ayanina y miricetina<sup>30</sup>, los compuestos polifenólicos ocupan el centro de atención en cuanto a actividad antioxidante respecta, y entre ellos los flavonoides constituyen el tipo de compuesto mayormente estudiado<sup>3</sup> por lo que estos metabolitos podrían ser los responsables de la actividad antioxidante de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth.

En un estudio realizado en diferentes extractos del látex de *Croton lechleri* por el método del DPPH se determinó que las fracciones etanólica y metanólica presentan el mayor porcentaje de inhibición de los radicales libres del DPPH, en comparación de la fracción hidroalcohólica<sup>58</sup>, por lo que el solvente de extracción elegido para el presente trabajo es el más adecuado. Otras fuentes revelan la actividad antioxidante de los aceites esenciales del género *Croton*, como el aceite esencial de *Croton urucurana* Baillon con un EC<sub>50</sub> de 3210 µg/mL determinado por el método del DPPH<sup>15</sup>, asimismo, Jaramillo et al (2010) determinó que el aceite esencial de *Croton malambo* tiene una actividad antioxidante de 2,2 mmol trolox/kg determinado por el método de decoloración del catión radical ABTS<sup>+</sup> <sup>14</sup>. Los compuestos fenólicos se encuentran presentes en, prácticamente, todas las partes de la planta; sin embargo, la distribución de estos compuestos no suele ser uniforme desde un punto de vista cualitativo ni cuantitativo. En situaciones de estrés se produce una acumulación de compuestos fenólicos y, dado el carácter antioxidante de éstos, se ha sugerido que los fenoles desempeñan un papel protector celular clave en estas circunstancias, es probablemente a este mecanismo que se evidencian diferencias de la capacidad antioxidante entre las diferentes especies de *croton*<sup>59</sup>.

El método DPPH es uno de los métodos *in vitro* más conocidos y frecuentemente empleados para evaluar la actividad antioxidante, que nos permite tener una idea



aproximada de los que ocurre en situaciones complejas, *in vivo*<sup>60, 61</sup>. Este ensayo puede utilizar como controles positivos el ácido ascórbico, ácido gálico, BHA,  $\alpha$ -tocoferol, quercetina, BHT, rutina, catequina o glutatión<sup>62</sup>, y la actividad antioxidante es medida con el valor IC<sub>50</sub>, que mientras más bajo sea, indica la mayor capacidad de los extractos para actuar como captadores de radicales DPPH. Las ventajas de este método es su excelente estabilidad en ciertas condiciones debido a la deslocalización de electrones libres sobre toda la molécula<sup>63</sup>, además de ser rápido, simple y económico en comparación con otros modelos<sup>59</sup>. La desventaja principal está en la dificultad de leer los resultados cuando se tienen sustancias cuyo espectro de absorción se solapa con el del radical; además el DPPH es un radical estable, centrado en el nitrógeno, que dista mucho de parecerse a las especies reactivas de importancia biológica; de hecho muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo no lo hacen así con DPPH, debido al impedimento estérico que representa la estructura química que rodea al radical, lo cual hace que sustancias pequeñas generalmente muestren una mayor actividad<sup>59, 64</sup>. Además, en comparación con otros métodos, el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico, y tiempo de medida necesario para realizar las medidas del DPPH (30 minutos) también supone una desventaja<sup>65</sup>.

## VI. CONCLUSIONES

- El “screening” fitoquímico de los extractos etanólicos de hojas de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth evidenció presencia de flavonoides, alcaloides, saponinas y esteroides para ambas especies.
- Los extractos etanólicos de hojas de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth presentaron actividad antioxidante con un IC<sub>50</sub> de 28,4 µg/mL y 62,42 µg/mL respectivamente.
- El extracto etanólico de hojas de *Croton thurifer* Kunth presentó actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis* ATCC 6633 con una CMI=1000 µg/mL; no se demostró la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Croton collinus* Kunth frente a las bacterias en estudio.
- El extracto etanólico de hojas de *Croton thurifer* Kunth presentó mayor actividad antioxidante y antibacteriana en comparación a *Croton collinus* Kunth.

## VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda ampliar el estudio de la actividad antioxidante y actividad antibacteriana de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth mediante otros métodos que permitan un mejor aislamiento de los metabolitos responsables de dichas actividades.
- Realizar la separación y caracterización de los metabolitos secundarios de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth.
- Determinar la actividad antibacteriana y actividad antioxidante de otras partes de las plantas de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ramirez L, Diaz H. Actividad Antibacteriana de Extractos y Fracciones del Ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). *Scientia et Technica* 2007; **1**(33): 397-400.
2. OMS. Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional: 2002-2005. Ginebra: OMS; 2002.
3. Escalona J. Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L. como premisa para su introducción en la medicina complementaria [Tesis]. Santiago de Cuba: Universidad de Oriente; 2011.
4. Berry P, Hipp A, Wurdack, K, Van Ee B, Riina R. Molecular Phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe *Crotoneae* (*Euphorbiaceae sensu stricto*) using its and TRNL-TRNF DNA sequence data. *Am J Bot.* 2005; **92**(9): 1520-1534.
5. Lima S, Cito A, Lopes J, Neto J, Chaves M, Silveira E. Fixed and volatile constituents of genus *Croton* plants: *C. adenocalyx* Baill-Euphorbiaceae. *Rev Latinoamer Quím.* 2010; **38**(3): 133-144.
6. Salatino A, Salatino M, Negri G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (*Euphorbiaceae*). *J Braz Chem Soc.* 2007; **18**(1): 11-33.
7. Socorro D, Muller A, Guilhon G, Alves C, Andrade E, Da Silva J, et al. Essential Oil Composition of *Croton palanostigma* Klotzsch from North Brazil. *J Braz Chem Soc.* 2009; **20**(6): 1188-1192.
8. Yaw P. Antibacterial Properties of *Croton* Species [Tesis]. Joensuu: University of Eastern Finland; 2012.
9. Cardoso N, Arruda T, Araújo A, Silva H, Ribeiro M, Nogueira P, et al. Antimicrobial and antibiofilm action of Casbane Diterpene from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria. *Arch Oral Biol.* 2012; **57**(5): 550-555.

10. Araújo V, Da Silva M, Leitaó E, Agra M, Athayde-Filho P, Curcino I, et al. Muscicapines a New Class of Guaiane-Type Sesquiterpene Alkaloids from *Croton muscicapa*. *J Braz Chem Soc.* 2005; **16**(3b): 553-557.
11. Barreto M, Gomes C, Vito J, Pinto F, Silveira E, Gramosa N. Flavonoides e Terpenoides de *Croton muscicarpa* (Euphorbiaceae). *Quim Nova.* 2013; **36**(5): 675-679.
12. Fuertes C, Benavides A, Pizza C, Napolitano A, Basarello C, Piacente S, et al. Estudio químico analítico de la fracción alcalóidica del extracto metanólico de las hojas de *Croton baillonianus* (AUBL). *Rev Soc Quím Perú.* 2012; **78**(2): 138-143.
13. García J, Escalona J, Do Carvalho M, Rojas J, Machado G, De La Vega J. Aislamiento y caracterización de metabolitos de hojas de *Croton linearis* Jacq. *Rev Cubana Quím.* 2015; **27**(3): 289-301.
14. Jaramillo B, Duarte E, Muñoz K, Stashenko E. Composición química volátil del aceite esencial de *Croton malambo* H. Karst. colombiano y determinación de su actividad antioxidante. *Rev Cubana Plant Med.* 2010; **15**(3): 133-142.
15. Simionatto E, Bonani V, Farias A, Ré N, Raposo J, Stuker C, et al. Chemical Composition and Evaluation of Antibacterial and Antioxidant Activities of the Essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) Stem Bark. *J Braz Chem Soc.* 2007; **18**(5): 879-885.
16. León K, Santiago J. Propiedades Antimicrobianas de Películas de Quitosano-Alcohol Polivinílico Embebidas en Extracto de Sangre de Grado. *Rev Soc Quím Perú.* 2007; **73**(3): 158-165.
17. Ramos E, Castañeda B, Ibañez V. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Rev Acad Perú Salud.* 2008; **15**(1): 42-46.

18. Tovar J. Determinación de la Actividad Antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecorregión cafetera [Tesis]. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira; 2013.
19. Payo A, Dominics M, Mayor J, Oquendo M, Sarduy R. Tamizaje fitoquímico preliminar de especies del género *Croton* l. *Rev Cubana Farm.* 2001; **35**(3): 203-206.
20. Bittner M, Alarcón J, Aqueveque P, Becerra J, Hernández V, Hoeneisen M, et al. Estudio Químico de Especies de la Familia Euphorbiaceae en Chile. *Bol Soc Chil Quím.* 2001; **46**(4): 419-431.
21. León B, Riina R, Berry P. Euphorbiaceae endémicas del Perú. *Rev peru Biol.* 2006; **13**(2): 295-301.
22. Rosales I, Clado I. Guía de Consultas Diversidad Vegetal. Corrientes: Facena (UNNE) eudicotiledóneas esenciales; 2000: 61-69.
23. Coy C, Gómez D, Castiblanco F. Importancia medicinal del género *Croton* (euphorbiaceae). *Rev Cubana Plant Med.* 2016; **21**(2): 234-247.
24. Hurbath F, Carneiro D, Roque N. Euphorbiaceae na Serra Geral de Licínio de Almeida, Bahia, Brasil. *Rodriguésia.* 2016; **67**(2): 489-531.
25. Lopes E, Neto M, Silveira E, Pessoa O, Braz R. Flavonoides e sesquiterpenos de *Croton pedicellatus* Kunth. *Quim Nova.* 2012; **35**(11): 2169-2187.
26. Murillo J. Composición y distribución del género *Croton* (Euphorbiaceae) en Colombia, con cuatro especies nuevas. *Caldasia.* 1993; **21**(2): 141-66.

27. Pérez J, Farfán C, Oliva B, Jayes P, Mérida M, Muñoz M. Determinación de los flavonoides en seis plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) nativas de Guatemala como posibles fuentes de nutraceuticos. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala; 2012.
28. Bonkanka C. Evolución farmacológica de terpenos y flavonoides de Origen vegetal. Servicio de publicaciones. [Tesis]. Tenerife: Universidad de la Laguna; 2007.
29. Obando LH. Estudio de los alcaloides de *Croton draconoides* “sangre de grado”, su actividad cicatrizante y el diseño de una forma farmacéutica. [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
30. Chiape AC. Estudio fitoquímico de las hojas de la especie vegetal *Croton schiedeianus* (Euphorbiaceae). [Tesis]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2013.
31. Turiel N, Ribeiro A, Carvalho N, Monteiro O, Lucas F, Carreira L, et al. Variability in Essential Oil Composition of Croton Species with Occurrence in the Eastern Brazilian Amazon. *Rec Nat Prod*. 2016; **10**(3): 380-384.
32. Oliveira G. Capacidad antioxidante de *Averrhoa carambola* L. (carambola) frente a sistemas generadores de radicales libres [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
33. Pardo D, Ortíz L. Tacha A, Murillo E, Mendez J, Murillo W. Estudio químico y etnobotánico de *Croton leptostachyu*. *Rev Acad Colomb Cienc*. 2014; **38**(149): 356-63.
34. Tamariz J, Capcha R, Palomino E, Aguilar J. Actividad antibacteriana de la Sangre de Grado (*Croton lechleri*) frente al *Helicobacter pylori*. *Rev Med Hered*. 2003; **14**(2): 81-88.

35. Donis J. Tipos de diseños de los estudios clínicos y epidemiológicos. *Avan Biomed.* 2013; **2**(2): 76-99.
36. Manterola C, Otzen T. Estudios Observacionales. Los diseños Utilizados con Mayor Frecuencia en Investigación Clínica. *Int J Morphol.* 2014; **32**(2): 634-645.
37. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2003; **88**(2-3): 199-204.
38. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1988.
39. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods.* 2007; **42**(4): 321-324.
40. Karuppusamy S, Rajasekaran K. High Throughput Antibacterial Screening of Plant Extracts by Resazurin Redox with Special Reference to Medicinal Plants of Western Ghats. *Global J Pharmacol.* 2009; **3**(2): 63-68.
41. Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M , Marchant R, et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett.* 2016; **38**(6): 1015-1019.
42. Ruiz J. Actividad Antifúngica *In Vitro* y Concentración Mínima Inhibitoria mediante Microdilución de ocho plantas medicinales [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013.



43. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol.* 2004; **26**(2): 211-219.
44. Aparcana I, Villarreal L. Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos del fruto de *Physalis peruviana* “aguaymanto” de diferentes lugares geográficos del Perú [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
45. Núñez W, Quispe R. Evaluación antioxidante y antienzimática *in vitro* y antiinflamatoria *in vivo* del extracto hidroalcohólico de la *Caesalpinia spinosa* “tara” [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
46. Corrales L, Castillo A, Melo A. Evaluación del potencial antibacterial *in vitro* de *Croton lechleri* frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas. *Nova.* 2013; **11**(19): 51-63.
47. Selowa S, Shai L, Masoko P, Mokgotho M, Magano S. Antibacterial activity of extracts of three *Croton* species collected in Mpumalanga region in South Africa. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2009; **7**(2): 98-103.
48. Panda S, Dutta S, Bastia A. Antibacterial activity of *Croton roxburghii* Balak. against the enteric pathogens. *J Adv Pharm Technol Res.* 2010; **1**(4): 419–422.
49. Wagate C, Mbaria J, Gakuya D, Nanyingi M, Kareru P, Njuguna A, et al. Screening of some Kenyan medicinal plants for antibacterial activity. *Phytother Res.* 2010; **24**(1): 150-153.
50. Ramírez L, Castaño D. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica.* 2009; **2**(42): 263-268.

51. Burgos A, Barua J, Flores M, Bazan D, Ferro E, Alvarenga N. Antibacterial activity of the alkaloid extract and isolated compounds from *Croton bonplandianum* Baill. (Euphorbiaceae). *Rev Bras Pl Med*. 2015; **17**(4): 922-927.
52. Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M, et al. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol*. 1996; **50**(1): 27-34.
53. Ahamd A, Mahmoud A, Williams H, Scott A, Reibebspies J, Mabry T. New sesquiterpene alpha-methylene lactones from the Egyptian plants *Jasonia candicans*. *J Nat Prod*. 1993; **56**(8): 1276-1280.
54. Touré D, Kouamé P, Bedi G, Djaman J, Guesssennd N, Oussou R, et al. Terpenes, Antibacterial and Modulatory Antibiotic Activity of Essential Oils from *Croton hirtus* L' Hér. (Euphorbiaceae) from Ivory Coast. *J. Essent. Oil Bear*. 2014; **17**(4): 607-616.
55. Balouiri M, Sadiki M, Koraichi S. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. 2016; **6**(2): 71–79.
56. Kolarević S, Milovanović D, Avdović M, Oalđe M, Kostić J, Sunjog K, et al. Optimisation of the microdilution method for detection of minimum inhibitory concentration values in selected bacteria. *Bot Serb*. 2016; **40**(1): 29-36.
57. Arnao I, Suárez S, Cisneros R, Trabuco J. Evaluación de la Capacidad Antioxidante de los extractos acuosos de la raíz y hojas de *Smallanthus sonchifolius* (Yacón). *Rev Soc Quím Perú*. 2012; **78**(2): 120-125.
58. Carrión R, Avilés R, León K, Santiago J. Evaluación de la actividad antioxidante, contenido de polifenoles totales y actividad antimicrobiana de fracciones de sangre de grado, *Croton lechleri*. Instituto Peruano de Energía Nuclear, 2010.

59. Altamirano I. Evaluación de la actividad antioxidante de cuatro especies del género *Croton* [Tesis]. Quito: Universidad Central del Ecuador; 2015.
60. Castañeda C, Ramos E, Ibañez V. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Horiz Med.* 2008; **8**(1): 56-72.
61. Alam N, Jahan N. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J.* 2013; **21**(2): 143–152.
62. Chanda S, Dave R. *In vitro* models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *Afr J Microbiol Res.* 2009; **3**(13): 981-996.
63. Irshad M, Zafaryab M, Singh M, Moshahid A. Comparative Analysis of the Antioxidant Activity of *Cassia fistula* Extracts. *Int J Med Chem.* 2012; **2012**: 1-6.
64. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol.* 1995; **22**(1), 25-30.
65. Kuskoski E, Asuero A, Troncoso A, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2005; **25**(4): 726-732.

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### Constancia de clasificación taxonómica de *Croton thurifer* Kunth

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ  
CONSULTOR BOTÁNICO  
C. B. P. N° 3796  
Tel: 4692651 RPM # 963689079  
e-mail:jocamde@gmail.com



#### CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ, BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

#### CERTIFICA:


Que, NORAH MIRYAM QUINTEROS ESPINO, con grado Académico de Bachiller, en egresada de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con fines de investigación científica, ha solicitado la certificación botánica de la planta conocida con el nombre vulgar de “cullishina”, la muestra ha sido determinada como *Croton thurifer* Kunth. Y en el Sistema de Clasificación Botánica de Arthur Cronquist, ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO	: Plantae
DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnoliopsida
SUBCLASE	: Rosidae
ORDEN	: Euphorbiales
FAMILIA	: Euphorbiaceae
GENERO	: <i>Croton</i>
ESPECIE	: <i>Croton thurifer</i> Kunth

Nombre vulgar: “cullishina”

Se expide la presente certificación para fines que se estime conveniente.

Lima, 03 de octubre del 2016

  
*Ricardo Campos*  
José R. Campos De La Cruz  
BIOLOGO  
C.B.P. 3796

Jirón Sánchez Silva # 156 – Urb. Santa Luzmila - Lima 07. Email: joricampos@yahoo.es

## ANEXO 2

### Constancia de clasificación taxonómica de *Croton collinus* Kunth

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ  
CONSULTOR BOTÁNICO  
C. B. P. N° 3796  
Tel: 4692651 RPM # 963689079  
e-mail:jocamde@gmail.com



#### CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ, BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

#### CERTIFICA:


Que, NORAH MIRYAM QUINTEROS ESPINO, con grado Académico de Bachiller, en egresada de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con fines de investigación científica, ha solicitado la certificación botánica de la planta conocida con el nombre vulgar de “mosquera”, la muestra ha sido determinada como *Croton collinus* Kunth. Y en el Sistema de Clasificación Botánica de Arthur Cronquist, ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO	: Plantae
DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnoliopsida
SUBCLASE	: Rosidae
ORDEN	: Euphorbiales
FAMILIA	: Euphorbiaceae
GENERO	: <i>Croton</i>
ESPECIE	: <i>Croton collinus</i> Kunth.

Nombre vulgar: “mosquera”

Se expide la presente certificación para fines que se estime conveniente.

Lima, 03 de octubre del 2016

  
*José R. Campos De La Cruz*  
José R. Campos De La Cruz  
BIOLOGO  
C.B.P. 3796



Jirón Sánchez Silva # 156 – Urb. Santa Luzmila - Lima 07. Email: joricampos@yahoo.es

### ANEXO 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<b>A</b>	<b>CE</b>	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	<b>CC</b>	M <sub>1</sub>
<b>B</b>	<b>CE</b>	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	<b>CC</b>	M <sub>2</sub>
<b>C</b>	<b>CE</b>	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	<b>CC</b>	M <sub>1</sub>
<b>D</b>	<b>CE</b>	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	<b>CC</b>	M <sub>2</sub>
<b>E</b>	<b>CE</b>	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	<b>CC</b>	M <sub>1</sub>
<b>F</b>	<b>CE</b>	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	<b>CC</b>	M <sub>2</sub>
<b>G</b>	<b>CE</b>	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	<b>CC</b>	CP
<b>H</b>	<b>CE</b>	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	<b>CC</b>	CP

**Figura 23. Diseño de la placa de microdilución colorimétrica**

#### ANEXO 4

	
<i>Croton thurifer</i> Kunth	<i>Croton collinus</i> Kunth

**Figura 24.** Reacción de identificación de flavonoides mediante la reacción de Shinoda, del extracto etanólico de hojas de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth



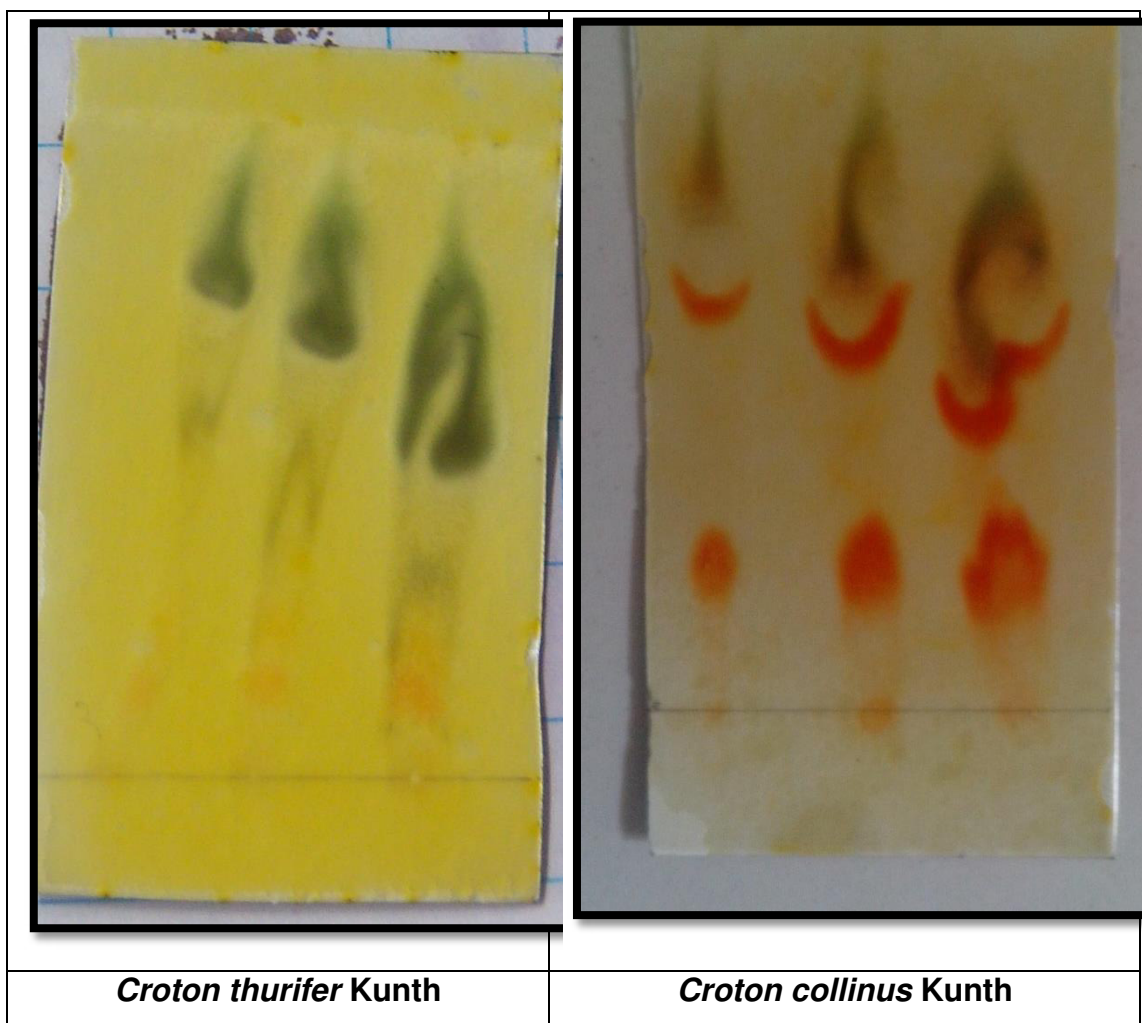
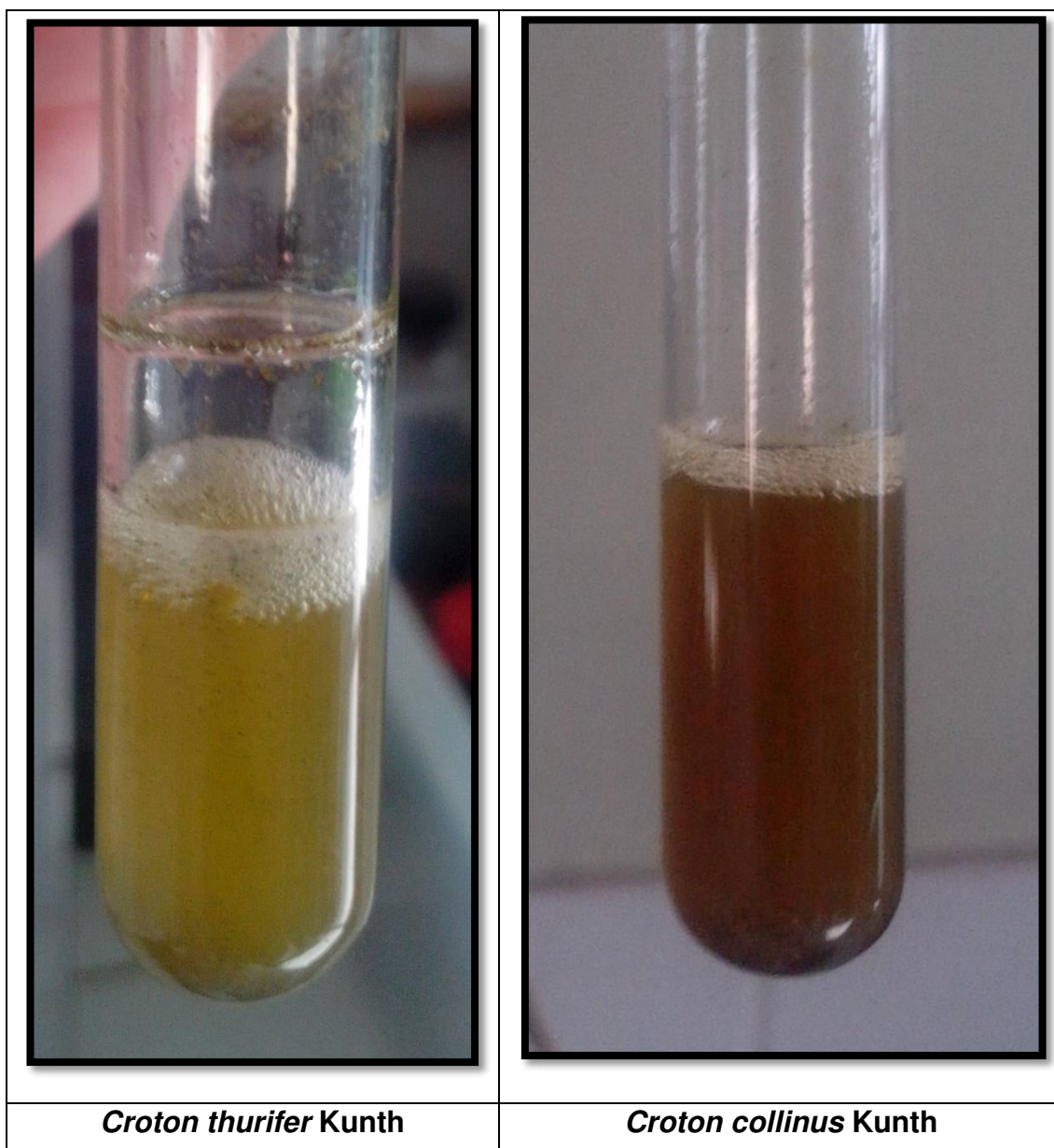


Figura 25. Cromatogramas de la reacción de identificación de alcaloides mediante la reacción de Dragendorff por CCD, del extracto etanólico de hojas de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth





**Figura 26. Reacción afrosimétrica de identificación de saponinas mediante la reacción de Agua destilada, del extracto etanólico de hojas de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth**


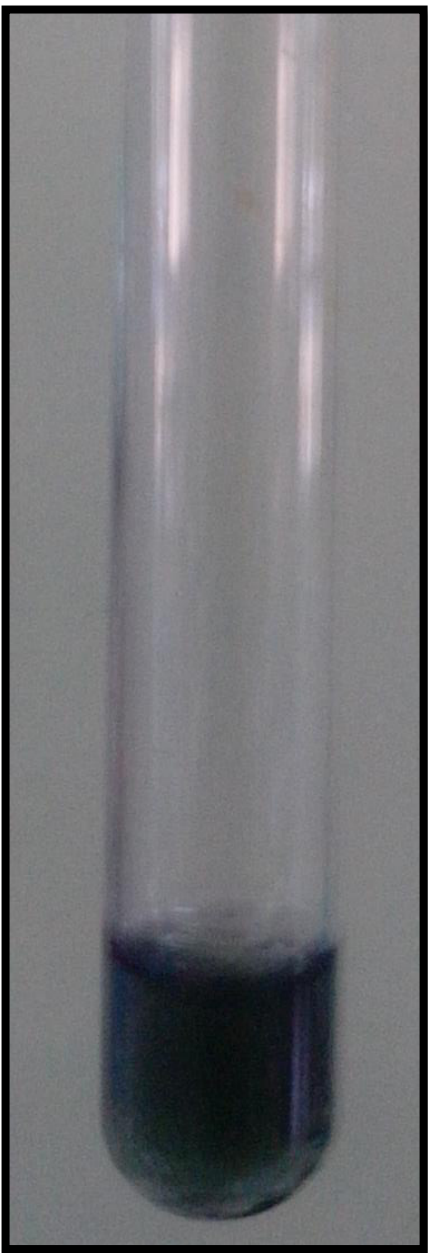
	
<p><i>Croton thurifer</i> Kunth</p>	<p><i>Croton collinus</i> Kunth</p>

Figura 27. Reacción de identificación de esteroides mediante la reacción de Liebermann Burchard, del extracto etanólico de hojas de *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth